

참명계로부터 천연 항균제 분리 및 정제

김세광 · 최광선* · 손석민
호서대학교 식품생물공학과, *중근당건강(주)

Isolation and purification of natural antimicrobial peptides from Munggae, *Halocynthia roretzi*

Se Kwang Kim, Kwang Sun Choi*, and Seok Min Son

Department of Food and Biotechnology, Hoseo University
*Chongkundang Healthcare Co. Ltd

Abstract

The objectives of this study were to isolate and purify the natural antimicrobial peptide from Munggae, *Halocynthia roretzi*. First, the crude antimicrobial extracts were obtained by treatment using 5% acetic acid. The antimicrobial activities of the crude extracts were 50% less than that of nisin and 50 times less than that of lysozyme. Their antimicrobial activities also showed great stability even after heat treatment at 100°C for 10 min. This was followed by gel permeation chromatography (GPC), preparative acid urea - polyacrylamide gel electrophoresis (Prep. AU-PAGE) and reversed phase - high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The purified peptide showed strong antimicrobial activity against *E. coli*. Through the purification processes, the peptide's antimicrobial activity increased 200 times more than the initial crude extract. As a result of tricine SDS-PAGE, the peptide was about 5.5 kDa molecular mass and existed as a monomer without disulfide bond. Therefore, the antimicrobial activities of Munggae extracts were mainly due to the antimicrobial peptides less than 10 kDa molecular mass.

Key words : Munggae, antimicrobial peptide, *Halocynthia roretzi*

서 론

우렁쟁이(명게), *H. roretzi*는 계통 분류학상 척추동물과 무척추동물의 중간위치에 존재하는 원색동물의 미색류에 속하는 부착생물로서 중간적 조성을 갖는 이유로 동물 면역체계의 진화적 기원을 규명하기 위한 매우 좋은 동물인 것으로 간주되어 왔으며, 근래에 들어 발생생물학, 면역화학, 신경 생리학 등의 연구 재료로 많이 이용되어지고 있다(Lee et al., 1993). 우렁쟁이에 관한 연구로는 생화학적 성분(Tsuchiya 와 Suzuki, 1962), 향기성분(Fujimoto et al., 1982), 계절 및 지역에 따른 엑스분 질소의

변화(Park et al., 1990)에 관한 연구 등 우렁쟁이의 성분에 관한 연구가 대부분이었으며, 가공적성(Kim et al., 1979), 젓갈 제조(Lee et al., 1993) 및 껍질 색소(Choi et al., 1994)의 이용에 관한 보고가 있으며 근육색소(Matsuno et al., 1984)와 갈변(Lee et al., 1993)에 관한 연구도 발표되었다. 최근에는 우렁쟁이로부터 추출된 생리활성물질 연구에 관한 관심이 집중되어 많은 연구 결과들이 발표되었고, 또한 많은 연구가 진행되고 있다.

국내에는 두 종류의 명게가 주로 서식하는 것으로 알려져 있다. 동해안에서 서식하는 비단명게라 불리는 *Halocynthia aurantium*과 남해안에서 주로 서식하거나 양식되는 참명게라 불리는 *Halocynthia roretzi*가 있다. 동해에 서식하는 *H. aurantium*의 경우 dicynthurin (Lee et al., 2001)과 halocidin (Jang et al., 2002)이라 명명된 항균 펩타이드가 분리정제되었다. 또한 일본에서는 수년전부터 참명게

*Corresponding author: Seok Min Son, Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan, Chungnam 336-795, Korea
Phone: +82-41-540-5643, Fax: +82-41-532-5640
E-mail: sson@office.hoseo.ac.kr

(*H. roretzi*)에 대한 연구를 통해 halocyanine과 같은 tetrapeptide 형태의 변형된 항균물질이 존재하는 것으로 알려졌다(Azumi *et al.*, 1990). 이는 명계 체액세포에 많은 항균 펩타이드들이 존재하고 있음을 의미한다.

동해안에서 서식하고 있는 비단명계(*H. aurantium*)와는 달리 남해안에서 서식하고 있는 참 명계(*H. roretzi*)는 매년 대량으로 양식되어지고 있다. 참 명계의 생산량은 2000년 2336 MT, 2001년 4603 MT에서 2005년 9334 MT으로 매년 증가하는 추세이다. 국내에서는 이러한 참 명계 껍질을 이용하여 화장품이나 식이 섬유원료로 이용하는 등의 제품 개발 연구가 활발히 진행 중이다(Yook *et al.*, 2000).

본 연구에서는 계통 분류학상 척추동물 바로 아래 단계의 원시 척색동물인 남해안에서 양식되어지고 있는 참 명계(*H. roretzi*)의 체액세포로부터 천연 항균물질을 추출, 분리 및 정제하는 방법에 대해 고찰하였다. 또한 분리 정제된 항균펩타이드(peptide)의 활성 및 물리적 성질을 알아보았다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서는 남해산 양식 명계인 참명계(우렁쉥이, *Halocynthia roretzi*)를 사용하였으며 체액세포를 얻기 위하여 살아있는 명계를 70% 에탄올(ethyl alcohol)로 표피를 세척한 후, 명계의 출수구와 입수구를 황으로 절개하여 체액을 모아, 0.05% (w/v) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)를 첨가하였다. 불순물을 제거시키기 위해 거르로 여과한 후 4°C에서 원심 분리(300×g, 10 min)하여 체액과 체액세포를 분리하였다. 분리된 체액세포들을 0.34 M sucrose 용액으로 재 현탁시킨 후 4°C에서 원심 분리(300×g, 10 min)하였다. 침전물로 얻어진 체액세포들은 추출 실험에 사용되기 전까지 -70°C에 보관하였다.

시약

항균활성 테스트의 비교 항균제로서 nisin (sigma, USA)과 lysozyme (sigma, USA)을 사용하였으며, 시약은 특급시약을 사용하였다.

산추출

5g의 체액세포를 5% (v/v) acetic acid 50 mL에 분산시킨 후 초음파 분쇄기(Bandelin, Germany)를

이용하여 15초 간격으로 5회 반복 처리하여 체액세포막을 파괴하였다. 5% (v/v) acetic acid 100 mL를 가하여 4°C에서 24시간 동안 교반시킨 후 4°C에서 원심 분리(2000×g, 25 min)하여 상등액을 취하였다.

Gel Permeation Chromatography (GPC)

체액세포의 산추출 상등액의 단백질을 정량한 후, 140 mg의 추출 단백질을 5% acetic acid를 이동상으로 하는 Sephadex G-50 (Sigma, USA) column (1.2×120 cm)에 통과시켰다. 이 때 flow rate는 6 mL/hr로 20분 당 한 분획(2 mL)을 얻어 총 120개의 분획물을 분리하였다. 분획된 산추출물들은 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Preparative Acid Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Prep. AU-PAGE)

GPC의 분획들은 Ultrasensitive radial diffusion assay (pH 7.4)방법을 통해 항균활성을 분석한 후, 항균 활성이 높은 분획들을 다시 모아 감압 건조기(Centra Evaporator, Bioneer, Korea)로 농축하였다. 농축된 시료에 sample buffer (9M urea, 5% acetic acid and methylgreen)를 더하여 Prep. AU-PAGE (Biorad, USA) Gel에 통과시켰다. Preparative AU-PAGE는 Harwig의 방법(Lehrer *et al.*, 1999)대로 수행하였다. Flow rate는 1 mL/min였으며, 총 120개의 분획을 얻어내었다. 분획의 10번 단위 별로 AU-PAGE (Ganz *et al.*, 1985)를 수행하여 전기적 전하량 차이에 의해 단백질 밴드를 분리하였다. 분리된 단백질 밴드를 가지고 overlay assay를 수행하여 각 밴드의 항균 활성을 확인하였다.

Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Overlay assay 방법을 통해 단백질 당 항균활성이 큰 분획들을 다시 모아 진공 건조기로 농축하였다. 농축된 단백질들을 C₁₈ column (218TP54 Vydac Co. USA)이 장착된 reversed-phase HPLC (Gilson 512, USA)를 통하여 용출시켰다. 이동상 용매 A는 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)가 포함된 HPLC water (Fisher, USA)를 사용하였고, 이동상 용매 B는 0.1% TFA가 포함된 acetonitrile (Fisher, USA)를 사용하였다. 95% 용매 A와 5% 용매 B로 10분간 평형을 유지시킨 후 0.5 mL/min 속도로 용출시키면서 용매 B의 농도를 5%에서 65%로 직선적으로 증가시켰다. 용출되는 분획들은 214 nm에서 흡

광도를 측정하였다. 각 피크에 해당되는 분획들의 항균활성은 radial diffusion assay (pH 7.4)로 확인하였다.

항균활성

항균활성 테스트는 주로 ultrasensitive radial diffusion assay 방법(Harwig *et al.*, 1993)을 사용하였다. 항균활성을 측정할 시료들은 진공 건조기(Bioneer, Korea)로 완전히 건조시킨 후 6 μ L의 0.01% acetic acid에 용해시켰다. 4×10^6 colony forming unit (CFU)로 계산된 대수 증기의 *E. coli* K112를 포함한 underlay agar에 일정한 간격으로 직경 3 mm의 구멍을 뚫은 후, 준비된 시료 5 μ L를 각 구멍에 넣었다. Underlay agar plate를 뒤집은 상태로 37°C에서 6시간 이상 배양하여, 균의 성장억제로 나타나는 투명한 크기로 항균활성의 정도를 확인하였다. 항균활성의 크기는 1 mm 크기의 clear zone을 임의로 10 unit의 항균활성으로 표시하였다. 또한 단백질 밴드와 항균활성을 동시에 확인하기 위해 overlay assay 방법을 사용하였다. 전기영동이 끝난 후 polyacrylamide gel을 멸균된 sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.4)로 15분간 2회 세척하였다. 세척된 겔을 underlay agar 위에 올려 놓고 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 전기영동된 단백질을 polyacrylamide gel에서 underlay agar로 이동시킨 후 polyacrylamide gel을 제거하고 overlay agar를 부어 뒤집은 상태로 6시간 이상 배양하여 항균활성을 확인하였다.

단백질 정량 및 분자량 확인

분리된 단백질의 분자량을 확인하기 위해 수정된 tricine SDS-PAGE (Schagger, 1987) 방법을 사용하였으며, 단백질 양을 BCA (Smith *et al.*, 1985) 방법으로 정량하였다.

결과 및 고찰

멍게추출물의 항균효과 및 열 안정성

멍게추출물의 항균효과를 알아보기 위해 같은 단백질 항균제인 lysozyme과 nisin을 비교 균으로 사용하여 *E. coli* K112에 대한 radial diffusion 항균테스트를 수행하였다(Fig. 1). 실험된 농도 범위에서 멍게 추출물의 항균력이 lysozyme이나 nisin보다는 낮음을 알 수 있었다. 그러나 lysozyme이나 nisin의 경우 순수 정제된 항균 단백질을 감안할 때 멍게

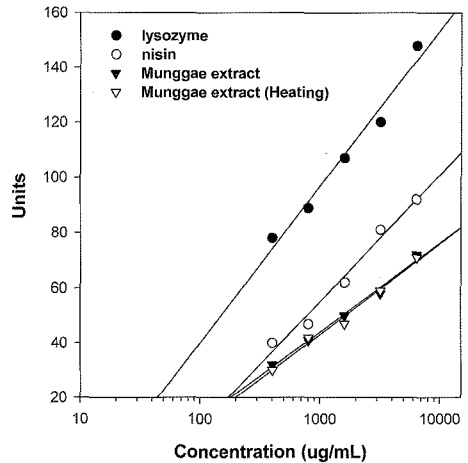


Fig. 1. Radial diffusion assays for antimicrobial activities of lysozyme, nisin and Munggae extracts against *E. coli*. Diameters of clear zone have been arbitrarily expressed in units (1 mm = 10 units).

추출물의 항균력이 매우 우수함을 알 수 있다. Nisin의 항균력이 lysozyme보다 낮게 나타난 것은 nisin의 항균영역이 그람 음성균보다는 그람 양성균에 효과가 있기 때문이다. 8 mm(80 unit)크기의 clear zone을 보일 때 lysozyme은 0.5 mg/mL, nisin은 5 mg/mL 그리고 멍게 추출물은 10 mg/mL의 저해 농도이었다. 그러므로 실험된 농도 범위에서 lysozyme은 약 20배, nisin의 경우에는 2배 정도 멍게추출물보다 강한 항균력을 보였다. 멍게 추출물의 활성을 증대시키기 위해서는 간단하게 한의 여과를 통한 특정크기의 펩타이드들을 농축함으로써 그 활성을 크게 증대시킬 수 있었다(data was not shown). 단백질 항균제의 식품응용 시 열 안정성의 유무가 실용화에 있어 매우 중요한 요소 중 하나이다. 멍게 추출물을 100°C에서 10분 간 가열처리 후 항균활성을 비교하여 보았다(Fig. 1). 모든 농도 범위에서 가열 처리를 하지 않은 추출물의 활성과 매우 유사하게 나타났다. 그러므로 멍게 추출물의 열에 대한 안정성이 매우 높음을 알 수 있다. 멍게 추출물의 항균활성은 주로 10 kDa 이하의 작은 크기의 항균 펩타이드에 기인하므로 열처리에 의한 펩타이드의 1차 구조가 파괴되지 않는 한 항균활성이 유지되는 것으로 사려 된다 (Jang *et al.*, 2002).

항균 펩타이드 분리 및 정제

멍게추출물을 10 kDa pore size 한외여과로 전 처리한 후 GPC를 수행하여 분자량 크기별로 분획하

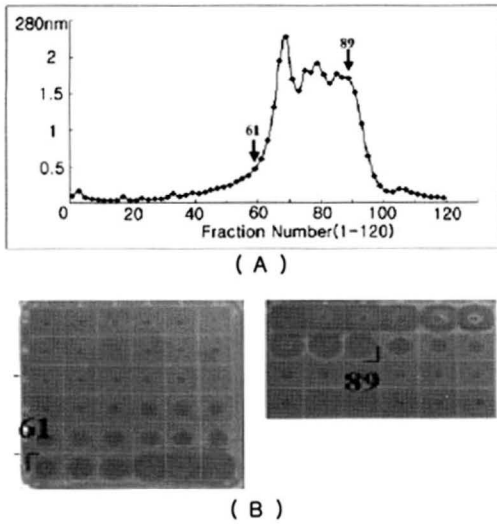


Fig. 2. Results of gel permeation chromatography (A) and their radial diffusion antimicrobial activities (B) of Munggae extracts.

였다. 140 mg의 명계 추출 단백질을 Sephadex G-50 이 충전 된 column에 6 mL/hr의 유속으로 통과시켜 20분에 한 개의 분획을 얻어 총 120개 분획물을 분리하여 흡광도를 측정하였다(Fig 2A). 그 결과 분획 40번부터 97번 구간에서 흡광도 값의 변화가 나타났으며 분획 68번부터 91번 구간에서 높은 흡광도 값을 보였다. 분획된 명계추출물 중 흡수 번에 해당하는 분획에서 100 μ L씩을 취하여 감압 건조 하여 acetic acid를 전부 휘발시킨 후 완충용액 (0.01% 초산)으로 재 현탁하여 *E. coli*에 대한 항균 활성을 확인 한 결과 분획 61번에서 89번 구간 사이에서 높은 항균력을 나타냈다(Fig 2B).

GPC 분획 중 항균활성이 가장 높게 나타난 구간 (61-89)을 다시 모아 감압 농축시킨 후 preparative AU-PAGE를 수행하여 전기적 전하량에 따라 총 120 개의 분획물을 얻었다. 각 분획물들을 10번 단위별로 acid urea 전기영동을 한 결과를 Fig. 3A에 나타내었다. 결과에서 알 수 있듯이 양전하가 큰 단백질로부터 (Lane 2, 15번 분획) 작은 단백질(Lane 4, 125번 분획)순으로 분리가 일어났다. 특히 25번과 45번 사이, 75번과 85번 사이에 많은 단백질들이 존재함을 알 수 있었다. 분리된 단백질의 항균활성을 알아보기 위하여 *E. coli*에 대한 overlay assay를 수행하여 Fig. 3B에 나타내었다. 그 결과 25번 분획과 85번 분획구간에서 뚜렷한 항균활성이 나타났으며 그중 25-35번 분획구간과 75-85번 분획구간에서

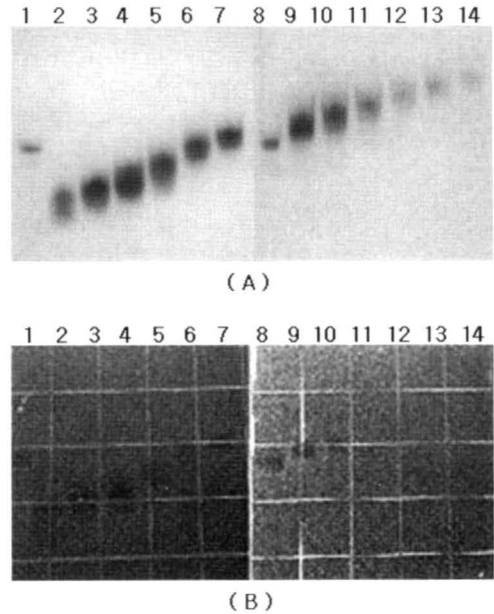


Fig. 3. Results of acid urea-polyacrylamide gel electrophoresis and their overlay antimicrobial activities of Munggae peptides. Lane 1, halocidin as a control; Lane 2, fraction No. 15; Lane 3, fraction No. 25; Lane 4, fraction No. 35; Lane 5, fraction No. 45; Lane 6, fraction No. 55; Lane 7, fraction No. 65; Lane 8, halocidin; Lane 9, fraction No. 75; Lane 10, fraction No. 85; Lane 11, fraction No. 95; Lane 12, fraction No. 105; Lane 13, fraction No. 115; Lane 14, fraction No. 125.

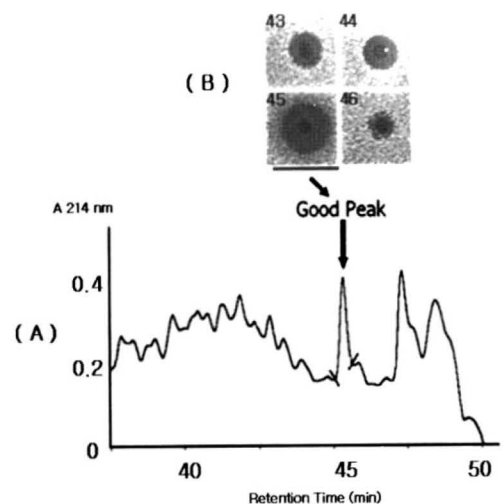


Fig. 4. Results of reverse phase - high performance liquid chromatography (A) as a final step to purify the Munggae extracts and their radial diffusion antimicrobial activities (B).

강한 항균활성을 확인하였다. 대조군으로는 비단명게로부터 분리정제(Jang *et al.*, 2002)한 항균펩타이드인 halocidin을 1번과 8번 lane에 전기영동 한 결과 55-75번 분획구간의 밴드(band)와 동일한 위치에 밴드가 형성되었으며 그 항균활성이 매우 강력함을 알 수 있었다.

AU-PAGE 및 overlay assay 결과를 토대로 halocidin과 비슷한 전하량을 가지고 있으면서 항균활성이 강한 71-80번 분획구간의 분취물을 선택하여 RP-HPLC 수행한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Retention time 45분, acetonitrile 농도 40%에서 단일 피크가 확인되었으며, 확인된 피크를 분취하여 항균활성을 검사한 결과 45분에서 매우 큰 활성을 보였다.

명게 항균 펩타이드 정제 과정을 보기 쉽게 5단계(산추출물, 10 kDa pore size로 한외여과, GPC, Preparative AU-PAGE 그리고 RP-HPLC)로 나누어 단계별로 acid urea 전기영동을 수행하여 Fig. 5A에 나타내었다. 각 단계의 정제과정을 거치면서 서서히 순수물질로 분리됨을 알 수 있다. 또한 전기영동 결과를 바탕으로 overlay 항균검사를 수행하여 Fig. 5B에 나타내었다. 단계별 정제 과정을 거치면서 분리된 밴드들의 항균력이 매우 우수하게 유지됨을 알 수 있다.

정제된 항균 펩타이드의 분자량 분석

정제된 항균 펩타이드의 분자량을 확인하기 위하여 Tricine SDS-PAGE를 수행한 결과 약 5.5 kDa 이하의 펩타이드임을 확인하였다(Fig. 6). 또한 대부

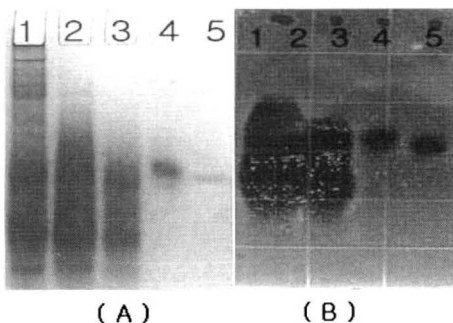


Fig. 5. Overview of purifying steps and their overlay antimicrobial activities from Munggae extract to purified peptides. Lane 1, crude Munggae extracts; Lane 2, 10 kDa pore size ultrafiltration; Lane 3, GPC; Lane 4, AU-PAGE; Lane 5, RP-HPLC.

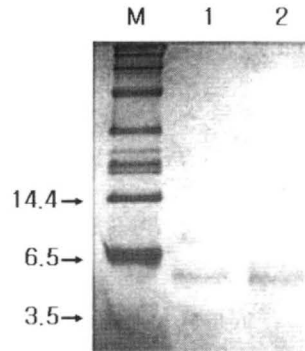


Fig. 6. Results of Tricine SDS-PAGE gel with the purified peptide from Munggae. Lane M, standard molecular weight markers; Lane 1, no treatment with 60 mM dithiothreitol (DTT); Lane 2, treatment with 60 mM dithiothreitol (DTT).

분의 항균 펩타이드들이 cysteine을 함유하고 있어 이황결합에 의한 dimer의 형태로 존재하는 경우가 많으므로 60 mM dithiothreitol (DTT)로 산화시켜 이황결합을 파괴한 후 전기영동을 수행하여 구조를 확인하였다. Fig. 6에서 알 수 있듯이 dithiothreitol (DTT) 비처리구와 처리구가 동일선상의 밴드가 나오므로 monomer 형태의 항균 펩타이드임을 알 수 있었다. 정확한 분자량 확인을 위해 TOF-MALDI Mass 검사를 의뢰(한국기초과학연구소)한 결과 5583.6 Da의 펩타이드였고 (Data was not shown) 또한 아미노산 순서 분석의뢰(한국기초과학연구소)를 하였으나 35번째 아미노산까지만 분석이 가능하였다. 단백질 database를 통해 유사도가 제일 높은 단백질을 찾아 본 결과 GTP binding 단백질이었고 분석된 35개의 아미노산중 9개의 아미노산만이 일치되었을 뿐 매우 낮은 유사도를 보였다. 비록 펩타이드의 아미노산 순서 분석은 실패하였지만 명게 조추출물의 항균활성은 약 10 kDa 이하의 항균펩타이드들에 주로 기인하였다. 특히 명게 추출물을 한외여과로 농축하여 특정 단백질 크기(10 kDa) 이하로 부분 정제함으로써 항균활성이 크게 증대하여 천연 항균제로 식품산업에 크게 활용할 수 있다.

요 약

해양 무척추 동물인 양식 참 명게로부터 천연 항균제를 추출 분리하기 위해서 명게의 체액세포를 5% acetic acid로 처리하여 조 추출물을 얻어내었다. 조 추출물의 항균활성을 nisin이나 lysozyme과 비교

한 결과 nisin과 lysozyme보다는 항균활성이 낮으나 단순 추출물임을 감안할 때 매우 우수한 항균력을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 열처리 (100°C, 10분) 후 항균활성의 변화가 거의 없어 천연항균제로서 식품산업에 응용할 수 있다. 멩게 추출물의 항균활성은 추출물 안에 여러 항균 펩타이드들이 기인하므로 본 실험에서는 조추출물을 3단계 정제과정을 통해 단일 물질로 정제하였다. 먼저 겔 투과 크로마토그래피를 통하여 분자량 크기별로 분획하였고, 항균활성이 우수한 분획구간을 다시 모아 preparative AU-PAGE 방법에 의해 전기적 전하량의 차이에 따라 다시 분획하였다. 항균활성이 가장 큰 분획구간 (No. 71-80)을 reversed phase-HPLC를 통해 단일 펩티드의 항균 펩타이드로 정제하였다. 정제된 항균물질의 크기는 5.5 kDa의 펩타이드였고 아미노산 순서분석은 약 50개 가량의 아미노산 중 35개까지만 분석이 가능하였다. 비록 분리 정제한 항균 펩타이드의 아미노산 구조분석을 완성하지는 못했지만 연간 10,000만톤 이상 양식 생산되는 멩게 추출물을 활용하여 천연 식품 보존제로서 활용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 호서대학교 교내 연구 사업(과제번호: 20040442)의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Azumi, K., M. Yoshimizu, S. Suzuki, Y. Ezura and H. Yokosawa. 1990. Halocyanines: novel antimicrobial tetrapeptide-like substances isolated from the hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biochemistry* **29(1)**: 159-65

Choi, B.D., S.J. Kang, Y.J. Choi, M.G. Youm and K.H. Lee. 1994. Utilization of ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunicate: 3. Carotenoid composition of ascidian tunicate. *Bull. Korean Fish. Soc.* **27(4)**: 344-350

Fujimoto, K., Y. Moyayama and T. Kaneda. 1982. Mechanism of the formation of ascidian flavor in *Halocynthia roretzi*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **48**: 1323

Ganz, T., R.B. Merrifield, D. Szklark, S.S. Harwig, K.A. Daher, D.F. Bainton and R.I. Lehrer. 1985. Defensins : Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **76**: 1427-1435

Harwig, S.S.L., N.P. Chen, A.S.K. Park and R.I. Lehrer.

1993. Purification of cysteine-rich bioactive peptides from leukocytes by continuous acid-urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **208**: 382-386

Jang, W.S., K.N. Kim, Y.S. Lee, M.H. Nam and I.H. Lee. 2002. Halocidin: a new antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*. *FEBS Letters* **521**: 81-86

Kim, W.J. and K.S. Kim. 1997. Suitability of *Cynthia roretzi* drasche for processing. *Bull. Korean Fish. Soc.* **12(1)**: 7-11

Lee, I.H., Y.S. Lee, C.H. Kim, C.R. Kim, T. Hong, L. Menzel, L.M. Boo, J. Pohl, M.A. Sherman, A. Waring and R.I. Lehrer. 2001. Dicynthaurin : an antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*. *Biochim. Biophys. Acta* **1527**: 141-148

Lee, K.H., H.S. Cho, D.S. Kim, B.I. Hong, C.S. Park and M.G. Kim. 1993. Utilization of ascidian, *Halocynthia roretzi*. Browning of ascidian meat, *Halocynthia roretzi* and its prevention. *Bull. Korean Fish. Soc.* **26(3)**: 214-220

Lee, K.H., H.S. Cho, D.H. Lee and J.H. Ryuk. 1993. Utilization of ascidian, *Halocynthia roretzi*. Processing and quality evaluation of fermented ascidian (I). *Bull. Korean Fish. Soc.* **26(3)**: 221-229

Lee, K.H., C.S. Park, B.I. Hong and W.J. Jung. 1993. Utilization of ascidian, *Halocynthia roretzi*. Chemical composition of ascidian and its seasonal and regional variation. *Bull. Korean Fish. Soc.* **26(1)**: 8-12

Lehrer, R.I., M. Rosenman, S.S. Harwig, R. Jackson and P. Eisenhaour. 1999. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial peptides. *J. Immunol. Methods* **137**: 167-173

Matsuno, T., M. Ookubo, T. Nishizawa and I. Shimizu. 1984. Carotenoids of sea squirt-I. *Chem. Pharm. Bull.* **32**: 4309

Park, C.K., T. Matsui, K. Watanabe, K. Yamaguchi and S. Konoso. 1990. Seasonal variation of nitrogenous constituents in ascidian *Halocynthia roretzi* tissues. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **56**: 1319

Schagger, H and G von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379

Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson and D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76

Tsuchiya, Y. and Y. Suzuki. 1962. Biochemical studies on the ascidian *Cynthia roretzi* v. Drasche-VIII. On general composition. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **28**: 231

Yook, H.S., Y.H. Kim, H.J. Ahn, D.H. Kim, J.O. Kim, and M.W. Byun. 2000. Rheological properties of wheat flour dough and qualities of bread prepared with dietary fiber purified from Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunicate. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32(2)**: 387-395