

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2024.16.1.055>

ISSN 2383-5400 (Online)

클로렐라 시스템에서 항균펩타이드 Magainin 2의 효율적인 세포외 분비

Efficient Extracellular Secretion of the Antimicrobial Peptide Magainin 2 in the Chlorella-based System

정유정¹, 황재윤², 김성천^{3*}Yu Jeong Jeong¹, Jae Yoon Hwang², Sung Chun Kim^{3*}¹수석연구원, (주)바이오이즈 중앙연구소 서울, 08390, 대한민국²선임연구원, (주)바이오이즈 중앙연구소 서울, 08390, 대한민국³대표이사, (주)바이오이즈, 서울, 08390, 대한민국

Central Research Institute, Biois. Co., Ltd., Seoul, 08390, Korea

(Received 19 Mar 2024, Revised 1 Apr 2024, Accepted 9 Apr 2024)

Abstract Various antimicrobial peptides (AMPs) from microalgae have shown antibacterial, antiviral, antifungal, anticancer, and antioxidant effects, and play crucial roles in medical applications, aquaculture-related disease management, and the food industry. Magainin 2 (MAG2), an AMP, exhibits high antibacterial and antitumor activity, necessitating an efficient recombinant expression system for low-cost, large-scale production. To enhance MAG2 secretion efficiency in *Chlorella*, we constructed the SS:MAG2:His vector using the known *Chlamydomonas reinhardtii* CA1 signal sequence (SS) and obtained a stable transformant via an Agrobacterium-mediated transformation method and RT-qPCR. ELISA results revealed that the MAG2 content secreted into the medium by the SS:MAG2:His transformants increased proportionally with mRNA expression. These findings offer a strategy for high MAG2 secretion in the *Chlorella vulgaris* platform, potentially minimizing downstream processing costs.

Keywords : *Chlorella vulgaris*, Antimicrobial Peptide, Magainin 2, Signal Sequence, Secretion

서 론

미세조류는 다양한 응용 분야에서 광범위하게 사용되는 생리 활성 화합물을 생산하는 광합성 세포 공장이다. 미세조류에서 아미노산, 다중불포화지방산, 다당류, 색소, 지질 플로로탄닌, 펩타이드, 페놀계, 카로티노이드, 피코시아닌, 테르펜, 스테롤, 인돌 알칼로이드, 방향족 유기산, 폴리케타이드, 하이드

로퀴논 등의 다양한 활성 화합물이 보고되고 있으며 [1, 2, 3], 항균, 항바이러스, 항염증 및 항알레르기 등을 포함한 다양한 약리학적 활성과 연계되어 있다 [4, 5]. 특히, 미세조류에 의해 생산된 펩타이드는 주로 *Chlorella vulgaris*, *Chlorella ellipsoidea*, *Navicula incerta* 및 *Nannocloopsis oculata*에서 생산되었으며 항균, 항바이러스, 항진균, 항암 항산화 효과가 입증되

* Corresponding author Sung Chun Kim
Phone: ***-****-**** Fax: 02-864-9954
E-mail: kimgp@biois.co.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

어, 의료에 응용, 양식 관련 질병 관리 및 식품 산업에서 중요한 역할을 한다 [6, 7].

항생제 내성 박테리아의 급속한 진화와 새로운 미생물 균주의 등장으로 항생제 사용량이 급격히 증가하여 [8], 새로운 대체 항생제의 필요성에 따라 치료제로써 항균펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)가 주목받고 있다 [9]. 면역시스템에 중요한 AMP는 모든 생물체가 가지고 있는 분자량이 10kDa 보다 작은 저분자 펩타이드로 생물체의 병원균 감염 시 1차 방어 물질로 작용하고 원핵세포 막을 표적으로 하여 작용하기에 넓은 항균 효과를 가진다 [10, 11]. 현재 AMP 데이터베이스 (Data Repository of Antimicrobial Peptides (DRAMP), <http://dramp.cpu-bioinform.org/>)에는 총 22528개의 항균펩타이드가 보고되고 있다 [12, 13]. 항균펩타이드는 주로 화학 합성으로 생산을 많이 하지만 상업화 과정에서 효율적인 생산 비용과 활성을 고려하여 유전공학 발현으로도 생산 가능하며, 숙주세포 독성과 단백질 분해에 대한 민감성으로 융합 단백질 접근법(용해도 향상, 응집 촉진 및 자가 절단 가능 등) [14, 15]이 알려져 있고 높은 결합 특이성과 낮은 독성으로 광범위한 항균 활성을 나타내는 천연 원료로부터 생산된 항균펩타이드를 이용하기도 한다 [16].

Magainin 2 (MAG2)는 아프리카발톱개구리 (*Xenopus laevis*)의 피부에서 분리된 다가양이온성 항균펩타이드로 23개의 아미노산으로 구성되며, 양친매성 α -helical 구조로, 세포막에 작용하여 toroidal pore를 형성, 막투과성과 막유동성을 변화시켜 세포에 작용한다 [17, 18]. 동물 세포에 대해 낮은 세포독성과 광범위한 항균 및 항진균 활성을 가지며 다양한 조직에서 발현될 뿐만 아니라, 높은 항바이러스 및 항종양 치료에도 적용된다 [19, 20, 21]. 또한, 아미노산 치환 기술로 MAG2의 여러 합성 유사체가 제작되었으며 대표적으로 치료목적의 Pexiganan (MSI-78)를 예로 들 수 있다. [22]. Magainin은 높은 항균 및 항종양 활성을 나타내기에 치료제로서의 확장을 위해 생물학적 활성 펩타이드를 대량으로 저렴하게 생산하려면 재조합 발현시스템이 필요하다 [23, 24]

본 연구에서는 *C. vulgaris* 발현시스템에서 항균 및 항진균 활성을 가지는 MAG2의 세포의 효율적인 단백질 분비를 위해 *Chlamydomonas reinhardtii* 유래의 Carbonic Anhydrase 1 (CA1) 신호 서열(Signal Sequence, SS)을 사용하고, 아그로박테리움 매개 형질전환 방법으로 *C. vulgaris*에 전달하여 MAG2의 세포의 분비 효율을 향상시켜 다운스트림 처리 비용을 최소화하기 위한 산업적 관련 단백질 분비에 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 미세조류 및 배지·배양 조건

본 연구에 사용한 *Chlorella vulgaris* AG10032의 배양 배지는 유기탄소원 0.5% glucose를 첨가한 BG (Blue-Green) 11배지를 사용하였으며 조성은 다음과 같다; NaNO₃ 1500 mg/L, K₂HPO₄ 40 mg/L, MgSO₄·7H₂O 75 mg/L, CaCl₂·2H₂O 36 mg/L, C₆H₁₀O₈ 6 mg/L, FeC₆H₅O₇·NH₄OH 6 mg/L, Trace metal solution 1 ml/L (Na₂-EDTA 1 mg/L, MnCl₂·4H₂O 1.81 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.22 g/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0.39 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.08 g/L, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.05 g/L, H₃BO₃ 2.86 g/L) [25]. 제조된 배지는 121°C에서 15분간 멸균, 냉각하여 250 ml 세포배양 플라스크에 접종액 1x10⁵ cells/ml를 넣고, 광주기 14 h:10 h (L:D), 배양온도 25°C, 광도 3200 lux, 150 rpm이 공급되는 진탕 배양기에서 배양하였다. UV/Vis 분광광도계 (Optizen pop, Mecacy, Korea)로 흡광도 O.D₆₈₀ (Optical Density, 680 nm)에서 측정 후 사용하였다.

2. 코돈 최적화된 MAG2와 신호 서열의 벡터 제작

C. reinhardtii 유래 CA1 (GenBank: D90206.1) [26]의 SS (MARTGALLLVALALAGCAQA)와 코돈 최적화 프로그램 [\(https://zendto.bioneer.co.kr/codon/index.py/\)](https://zendto.bioneer.co.kr/codon/index.py/)을 이용한 MAG2 펩타이드 (GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS, NP_001081306) [27]에 6xHis Tag로 구성된 서열을 바이오닉스에 의뢰하여 합성하였다. 합성 서열 양 끝은 각각 *SpeI*과 *BstEII* 제한효소를 가지고 있어, 이들 제한효소

(Enzynomics, Korea)를 이용하여 식물 바이너리 벡터 pCAMBIA1302 (GenBank: AF234298.1)에 T4 DNA ligase (M1801, Promega, USA)로 삽입 후 클로닝하고 이를 SS:MAG2:His로 표기하였다(Figure 1A).

3. 아그로박테리움 형질전환체 제작 및 선별

제작된 SS:MAG2:His 플라스미드 DNA는 *Agrobacterium*의 freeze-thaw 방법을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (O.D₆₀₀=0.8)에 도입 후 [28], 10 µg/µl Gentamycin (Gen¹⁰), 50 µg/µl Rifampicin (Rif⁵⁰)과 50 µg/ml Kanamycin (Kan⁵⁰)이 첨가된 LB (Difco, Laboratories, USA) 배지에서 자란 콜로니에서 플라스미드 DNA가 제대로 삽입되었는지를 확인하기 위해 *MAG2* 유전자 특이적 프라이머 (*MAG2_F*: 5'-GGCATTGGCAAGTTTCTGCA-3', *MAG2_R*: 5'-CGAGTTCATAATCTCCCCGA-3')를 제작하여 EmeraldAmp GT PCR Master Mix (RR300A, Takara Bio, Korea)로 반응 조건 I 단계 98°C-1분, II 단계 30 cycles; 98°C-10초/57°C-30초/72°C-30초로 PCR 하였다.

4. 아그로박테리움 매개 공동배양을 통한 형질전환

SS:MAG2:His가 도입된 아그로박테리움 균주는 LB (Gen¹⁰, Rif⁵⁰, Kan⁵⁰) 배지에 접종 후, 28°C에서 암배양(O.D₆₀₀=0.7) 하여 접종액으로 사용하였다.

*C. vulgaris*는 0.5% glucose가 첨가된 BG11 액체 배지에서 25°C, 5일 동안 암배양 후, 형질전환 전배양(O.D₆₈₀=1)으로 사용하였다. Cha 등 방법(2012)을 변형하여 아그로박테리움 접종액과 *C. vulgaris* 전배양액은 120 rpm/200 rpm에서 원심분리 후, 상등액을 제거하고, 유도 배지(100 µM acetosyringon이 첨가된 BG11 배지)로 세척 후 재현탁 하였다 [29]. 유도 배지로 재현탁 된 아그로박테리움을 *C. vulgaris*와 혼합 후, 25°C 암조건에서 5일간 공동배양하고, 20 µg/ml Hygromycin (Hyg²⁰)과 150 µg/ml Cefotaxime (Cef⁵⁰)이 포함된 BG11 (0.5% glucose 첨가) 고체배지에서 2일 동안 암배양 하였다. 양광저온배양기 (DS-53FPL, DASOL Science, Korea)로 옮겨 증식시킨 후, 항생제(Hyg²⁰, Cef⁵⁰)에 저항성을 보이는 콜로

니를 2주 간격으로 3회 연속 계대 배양하여 안정적인 개체들을 선별하였다.

5. 도입 유전자 및 mRNA 발현 확인

형질전환 시킨 클로렐라에서 *MAG2* 유전자 도입 유무 및 mRNA 발현을 확인하기 위해 안정화된 콜로니를 대상으로 Genomic DNA (gDNA) PCR과 RT-PCR를 수행하였다. SDS 추출 버퍼로 gDNA를 분리하고 [30], 이들을 주형으로 *MAG2* 유전자 특이적 프라이머와 EmeraldAmp GT PCR Master Mix를 사용하여 반응 조건 I 단계 98°C-1분, II 단계 30 cycles; 98°C-10초/57°C-30초/72°C-30초로 PCR 하였다.

유전자 도입이 확인된 *C. vulgaris* 형질전환체에서 *MAG2* 유전자의 발현 여부를 확인하기 위해 0.5% glucose가 첨가된 BG11 액체배지(Hyg²⁰, Cef⁵⁰)에 접종하고 5일 동안 150 rpm에서 배양한 후, 음성대조군인 형질되지 않은 *C. vulgaris*와 함께 TRIzol Plus RNA Purification Kit (#12183555, Invitrogen, USA)로 총 RNA를 추출하고, M-MLV RT-Kit (BR122-10k, BioFACT, Korea)로 cDNA를 합성하였다. 이들을 주형으로 *MAG2* 유전자 특이적 프라이머 세트와 internal control 프라이머 세트(18S rRNA_F: 5'-TTCTATGGGTGGTGGTGCATG-3', 18S rRNA_R: 5'-GCGAACCAACCGTGACTATT-3')를 사용하여 EmeraldAmp GT PCR Master Mix와 함께 반응 조건 I 단계 98°C-1분, II 단계 30 cycles; 98°C-10초/57°C-30초/72°C-30초로 SimpliAmp Thermal Cycler (A24811, Applied Biosystems, USA) 증폭 후, 발현을 분석하였다.

6. 분비된 펩타이드 함량 확인

MAG2 유전자 도입과 mRNA 발현이 확인된 *C. vulgaris* 형질전환체에서 세포외로 분비된 *MAG2* 함량을 확인하기 위하여, mRNA 발현 배양조건과 동일 조건으로 배양 후 원심분리하여 상층액을 모두 회수하여 His-tag ELISA detection kit (L00436, Genscript, USA)의 제조사 매뉴얼에 따라 측정하였다. His Tag Standard와 배양액을 His Tag Plate의 각

well에 분주하고, Anti-His Monoclonal Antibody 첨가 후 상온에서 30분 배양, 4번 세척 하였다. Antibody Tracer를 넣고 상온에서 추가로 4번 세척하고 TMB substrate 첨가하여 10분간 반응시킨 뒤 Stop 버퍼를 넣고 450 nm에서 측정하였다. 표준곡선과 함께 실험 결과는 평균값과 표준편차를 오차범위로 표기하였다.

8. 통계 분석

데이터 유의성 분석을 위해 Windows SPSS(버전 12.0)를 이용하였으며, One-way analysis of variance (ANOVA)를 시행한 후 Student's *t*-test로 검정하였다.

결 과 및 고 찰

항균펩타이드는 대다수의 생명체에 분포하며 외부 미생물 침입으로부터 자신을 방어하기 위한 중요 역할을 하며 기존 항생제와 달리 주로 미생물의 세

포막에 빠르게 작용하여 활성을 보이고 세포독성이 거의 없어 항생제 대체제 또는 감염자·암 환자를 위한 대안 치료제로 주목받고 있다. 다양한 방법의 항균펩타이드 생산 연구가 시도되고 있으나, 산업적으로 활용 가능 수준의 기술 개발이 더 필요한 실정이다.

본 연구에서는 항균펩타이드인 MAG2의 안정적이면서 고효율의 세포외 분비 발현시스템을 개발하기 위해 *C. vulgaris*에서 배양액 내로의 분비 방법을 적용하였다. 기보고된 미세조류 *C. reinhardtii* CA1의 SS와 항균펩타이드 MAG2가 재조합된 SS:MAG2:His 벡터를 제작하였다 [30]. 제작된 벡터는 모든 조직에서 유전자 발현을 유도하는 Cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) 프로모터 [31]를 가지고 있는 식물 바이너리 벡터이다(Figure 1A).

제작된 SS:MAG2:His의 플라스미드 DNA는 MAG2 유전자 특이적 프라이머로 PCR 하여 69 bp 산물을 확인하였다(Figure 1B). 이를 Agrobacterium에 freeze-thaw 방법으로 도입하고 [28], LB 고체배지 (Gen¹⁰, Rif⁶⁰, Kan⁵⁰)에서 자란 콜로니는 DNA를 추출하여 MAG2 특이적 프라이머와 함께 PCR 확인 결과, 69 bp 산물의 MAG2를 확인하였다.

아그로박테리움 매개 *C. vulgaris* 형질전환을 위해 Agrobacterium SS:MAG2:His 접종액 및 전배양된 *C. vulgaris*는 본문의 재료 및 방법에 따라 5일간 공동 배양하여 형질전환 하였다. 0.5% glucose를 첨가한 BG11 고체배지(Hyg^R, Cef^R)에서 항생제에 저항성을 보이는 *C. vulgaris*를 스크리닝하고(Figure 2A), 이들을 2주 간격으로 3회에 걸쳐 연속 계대 배양하여 안정적인 *C. vulgaris*를 대상으로 gDNA를 추출하였다(Figure 2B). 형질전환 시킨 *C. vulgaris*의 염색체 내에 MAG2 유전자 삽입을 확인하기 위해 MAG2 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 PCR 한 결과, 음성대조군인 형질전환 되지 않은 *C. vulgaris*에서는 어떠한 밴드도 검출되지 않았고 SS:MAG2:His로 형질전환 시킨 *C. vulgaris*에서 MAG2의 69 bp 산물이 확인되었다. 따라서, SS:MAG2:His 형질전환된 *C. vulgaris* 염색체 내에 MAG2 유전자 도입 결과를 확인하였다(Figure 2C).

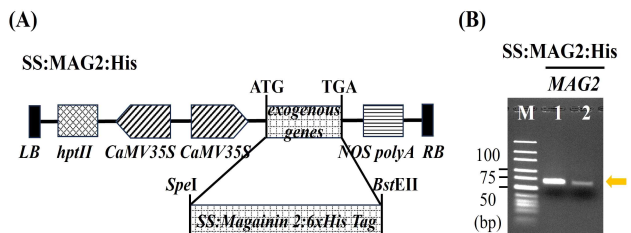


Figure 1. Characteristics of the SS:MAG2:His vector introduced into Agrobacterium (A) Schematic representation of the binary vector constructs SS:MAG2:His used for *C. vulgaris* transformation in this study. LB, T-DNA left border; RB: T-DNA right border; *hptIII*, hygromycin resistant gene; CaMV 35S, Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter; His tag, 6xHistidine epitope tags; SS: Signal Sequence; NOS polyA, NOS nopaline synthase terminator. (B) PCR of the SS:MAG2:His. The orange arrow indicate the 69 bp fragments of MAG2. Lanes M, the GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder; Lane 1, the *E. coli* PCR product; Lanes 2, the *A. tumefaciens* PCR product.

C. vulgaris 염색체내에 *MAG2* 도입이 확인된 형질 전환체들을 대상으로 *MAG2* mRNA 발현을 확인하기 위해 5일 동안 배양한 음성대조군과 형질전환체를 사용하여 RT-qPCR을 수행하였다. *MAG2* mRNA 발현을 분석한 결과, *MAG2*가 도입된 대표적인 형질 전환체(T1~T2)에서 *MAG2* mRNA의 안정적인 발현 증가를 확인하였다(Figure 2D). 이를 통해 *C. vulgaris* 형질전환체 내에 *MAG2* 유전자가 *C. vulgaris* 염색체

내에 삽입되어 있고 삽입된 유전자의 전사가 정상적으로 일어나고 있음을 확인하였다. 최근까지 미세조류에서 재조합 단백질을 생산하기 위해 여러 종류의 목적 단백질이 형질전환 되었으며, 외래 유전자의 안정적인 발현이 연구되고 있다 [32, 33].

mRNA 발현이 확인된 형질전환 *C. vulgaris* (T1~T2)에서 배양액 내로의 효과적인 *MAG2* 분비 여부를 확인하기 위하여 mRNA 발현 실험조건과 동일 조건으로 배양 후, ELISA assay 수행하였다. SS:*MAG2*:His 형질전환체(T1~T2)의 배양액 내로 분비된 *MAG2* 함량은 음성대조군과 차별적으로 T1~T2에서 뚜렷하게 증가하였으며, mRNA 발현에 비례하여 배양액 내 분비도 증가하였다(Figure 3D). SS:*MAG2*:His 형질전환체(T1~T2)의 세포 내에서 *MAG2* 함량에 대한 ELISA assay 시, 형질전환 되지 않은 음성대조군과 차별되게 증가하였으나, 형질전환 개체별로는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다(결과 미제시). 이는 CA1의 SS가 *MAG2*의 배양액 내로 분비되는 발현 증가에 더 도움이 되었음을 나타낸다. 미세조류를 단백질 분비를 위한 대체 숙주로 확립하기 위해서는 도입 유전자 발현 개선, 코돈 최적화, 성능이 향상된 프로모터 등과 같은 분비된 단백질의 수율을 향상시키기 위한 최적화 전략 시스템이 필요하다 [34, 35, 36]. 세포외 분비 시스템은 세포내 단백질 정제 시스템보다 상대적으로 스텝이 덜 복잡하여 비용 효율적 플랫폼이다 [37]. 따라서, 항균펩타이드 *MAG2*와 *C. reinhardtii* 유래 SS 구성으로 벡터를 제작하여 아그로박테리움 매개 형질전환 방법으로 *C. vulgaris*에 형질전환 결과, 클로렐라 발현 벡터 시스템에서 효율적인 *MAG2*의 세포외 분비 생산을 확인하였다.

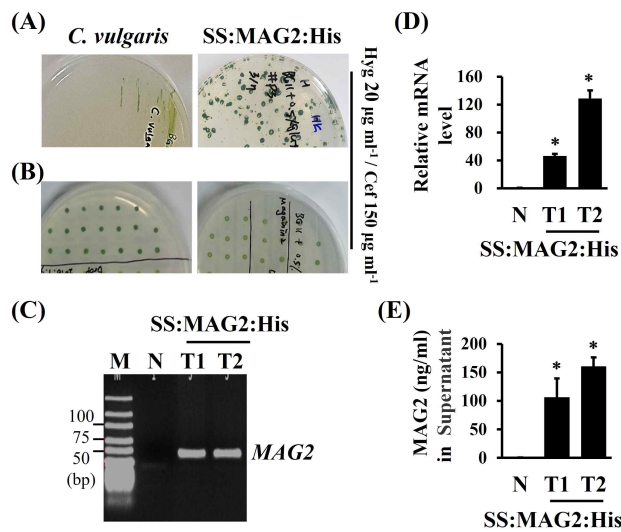


Figure 2. Screening and mRNA levels of *C. vulgaris* transformants, SS:*MAG2*:His. (A) Colony formation of Agrobacterium-mediated *C. vulgaris* transformation on the selection plates including 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Hygromycin and 150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Cefotaxime. (B) Stable transformants obtained through serial subcultures at 2-week intervals on the selective medium containing Hyg²⁰ and Cef¹⁵⁰. (C) PCR analysis confirmation from gDNA of the SS:*MAG2*:His transformants using the *MAG2* specific primers. Lanes M, the GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder; T1~T2, two independent transformants; N, the negative control based on non-transformed *C. vulgaris*. (D) Relative expression levels measured by RT-qPCR in the untransformed and the transformed *C. vulgaris*. Error bars indicate the standard error (S.E.). The *18S rRNA* gene was used as an internal control. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.005$, Student's *t*-test) (E) Quantitation of *MAG2* in the supernatant of the transformed *C. vulgaris* using ELISA assay. ($p < 0.001$, Student's *t*-test)

결론

AMP 중의 하나인 Magainin 2 (*MAG2*)는 항균 및 항종양 활성이 높고 치료제에 적용되어 저비용으로 대량 생산하기 위해서는 효율적인 재조합 발현 시스템이 필요합니다. 클로렐라에서 *MAG2*의 효율적인 분비를 증가시키기 위해, 이미 알려진 *C.*

reinhardtii 유래 CA1 신호 서열(SS)과 코돈 최적화된 MAG2를 이용하여 SS:MAG2:His 벡터를 제작하고, 제작된 벡터를 아그로박테리움 매개 형질전환 방법과 RT-qPCR을 이용하여 클로렐라에서 안정한 형질 전환체를 얻었다. mRNA 발현 실험조건과 동일 조건으로 배양한 SS:MAG2:His 형질전환체에서 MAG2의 단백질 발현을 ELISA assay로 분석 결과, 성공적으로 발현되었으며 배양액으로 분비되는 MAG2의 함량은 mRNA 발현에 비례하여 증가하였다. 우리의 결과는 *C. vulgaris* 플랫폼에서 MAG2의 효율적인 세포외 분비 생산 전략을 제공하며 다운스트림 처리 비용을 최소화하기 위한 시스템에 활용될 수 있다.

References

- Marrez, D. A., Naguib, M. M., Sultan, Y. Y. and Higazy, A. M. 2019. Antimicrobial and anticancer activities of *Scenedesmus obliquus* metabolites. *Heliyon*. 5(3), e01404.
- Shannon, E. and Abu-Ghannam, N. 2016. Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Mar. Drugs*. 14(4), 81.
- Gong, Y., Hu, H., Gao, Y., Xu, X. and Gao, H. 2011. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38(12), 1879-1890.
- Lauritano, C., Andersen, J. H., Hansen, E., Albrigtsen, M., Escalera, L., Esposito, F., Helland, K., Hanssen K. Ø., Romano, G. and Ianora, A. 2016. Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities. *Front. Mar. Sci.* 3, 1-12.
- Patra J. K., Patra A. P., Mahapatra N. K., Thatoi H. N., Das S., Sahu R. K. and Swain G. C. 2009. Antimicrobial activity of organic solvent extracts of three marine macroalgae from Chilika Lake, Orissa. *India. Malays. J. Microbiol.* 5, 128-131.
- Kim, S. K. and Wijesekara I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J. Funct. Foods*. 2010, 2:1-9.
- Ayswaria, R., Vijayan, J. and Nathan, V. K. 2023. Antimicrobial peptides derived from microalgae for combating antibiotic resistance: Current status and prospects. *Cell Biochem. Funct.* 41(2), 142-151.
- Dingmann, B. J. 2018. Searching for New Antibiotics Right Under our Feet. *J. Public Health Issues Pract.* 2, 111.
- Lagadinou, M., Onisor, M. O., Rigas, A., Musetescu, D. V. Gkentzi, D., Assimakopoulos, S. F., Panos, G. and Marangos, M. 2020. Antimicrobial Properties on Non-Antibiotic Drugs in the Era of Increased Bacterial Resistance. *Antibiotics*. 9, 107.
- Huan, Y., Kong, Q., Mou H. and Yi, H. 2020. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* 11, 582779.
- Zhang, Q. Y., Yan, Z. B., Meng, Y. M., Hong, X. Y., Shao, G., Ma, J. J., Cheng, X. R., Liu, J., Kang, J. and Fu, C. Y. 2021. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Mil. Med. Res.* 8(1), 48.
- Kang, X., Dong, F., Shi, C., Liu, S., Sun, J., Chen, J., Li, H., Xu, H., Lao, X. and Zheng H. 2019. DRAMP 2.0, an updated data repository of antimicrobial peptides. *Sci. Data*. 6(1), 148.
- Shi, G., Kang, X., Dong, F., Liu, Y., Zhu, N., Hu, Y., Xu, H., Lao, X. and Zheng, H. 2022. DRAMP 3.0: an enhanced comprehensive data repository of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.* 50(D1), D488-D496.
- Barrell, P. J., Liew, O. W. and Conner, A. J. 2004. Expressing an antibacterial protein in bacteria for raising antibodies. *Prot Expr Purif.* 33, 153-159.
- Li Y. 2011. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Prot Expr Purif.* 80, 260-267.
- Imperial, I. C. V. J. and Ibanez, J. A. 2016. Addressing the Antibiotic Resistance Problem with Probiotics:

- Reducing the Risk of Its Double-Edged Sword Effect. *Front. Microbiol.* 7, 1983.
17. Zasloff M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84(15), 5449-5453.
 18. Imura, Y., Choda, N. and Matsuzaki, K. 2008. Magainin 2 in action: distinct modes of membrane permeabilization in living bacterial and mammalian cells. *Biophys. J.* 95(12), 5757-5765.
 19. Chen, H. C, Brown, J. H., Morell, J. L. and Huang, C. M. 1988. Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 236, 462-466.
 20. Tachi, T., Epand, R. F., Epand, R. M. and Matsuzaki, K. 2002. Position-dependent hydrophobicity of the antimicrobial magainin peptide affects the mode of peptide-lipid interactions and selective toxicity. *Biochemistry.* 41(34), 10723-10731.
 21. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415, 389-395.
 22. Gottler, L. M. and Ramamoorthy, A. 2009. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan-a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788(8), 1680-1686.
 23. Wright O, Yoshimi T. and Tunnacliffe A. 2012. Recombinant production of cathelicidin-derived antimicrobial peptides in *Escherichia coli* using an inducible autocleaving enzyme tag. *N. Biotechnol.* 29, 352-358.
 24. Zorko, M. and Jerala, R. 2010. Production of recombinant antimicrobial peptides in bacteria. *Methods Mol. Biol.* 618, 61-76.
 25. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and Cohen-Bazire, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bac. Rev.* 35, 171-205.
 26. Fujiwara, S., Fukuzawa, H., Tachiki, A. and Miyachi, S. 1990. Structure and differential expression of two genes encoding carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(24), 9779-9783.
 27. Guerrero, E., Saugar, J. M., Matsuzaki, K. and Rivas, L. 2004. Role of positional hydrophobicity in the leishmanicidal activity of magainin 2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(8), 2980-2986.
 28. Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A. and Messens, E., van Montagu, M., and Schell, J. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 163, 181-187.
 29. Futatsumori-Sugai, M. and Tsumoto, K. 2010. Signal peptide design for improving recombinant protein secretion in the baculovirus expression vector system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391(1), 931-935.
 30. Lauersen, K. J., Berger, H., Mussnug, J. H. and Kruse, O. 2013. Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biotechnol.* 167, 101-110.
 31. Amack, S. C. and Antunes, M. S. 2020. CaMV35S promoter-a plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Curr. Opin. Plant Biol.* 24, 100179.
 32. Montero-Lobato, Z., Vazquez, M., Navarro, F., Fuentes, J.L., Bermejo, E., Garbayo, I., and Vilchez, C. and Cuaresma, M. 2018. Chemically-Induced Production of Anti-Inflammatory Molecules in Microalgae. *Mar. Drugs.* 16(12), 478.
 33. Bai, L. L., Yin, W. B., Chen, Y. H., Niu, L. L., Sun, Y. R., Zhao, S. M., Yang, F. Q., Wang, R. R., Wu, Q., Zhang, X. Q. and Hu, Z. M. 2013. A new strategy to produce a defensin: stable production of mutated NP-1 in nitrate reductase-deficient *Chlorella ellipsoidea*. *PLoS One.* 8(1), e54966.
 34. Kong, F., Yamasaki, T., Kurniasih, S. D., Hou, L., Li, X., Ivanova, N., Okada, S. and Ohama T. (2015) Robust expression of heterologous genes by selection marker fusion system in improved *Chlamydomonas* strains. *J. Biosci. Bioeng.* 120, 239-245.
 35. Barahimipour, R., Strenkert, D., Neupert, J., Schroda,

- M., Merchant, S. S. and Bock, R. (2015) Dissecting the contributions of GC content and codon usage to gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 84, 704-717.
36. Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Georgianna, D. R., Lofgren, S. M., Li, D., Ellis, R. C., Carruthers, D. N., Dräger A., David L., Masica D. L. and Mayfield S. P. (2016) Synthetic promoters capable of driving robust nuclear gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res.* 15, 135-142.
37. Erdene-Ochir, E., Shin, B. K., Kwon, B., Jung, C. and Pan, C. H. 2019. Identification and characterisation of the novel endogenous promoter HASP1 and its signal peptide from *Phaeodactylum tricornerutum*. *Sci. Rep.* 9(1), 9941.