(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월07일
(11) 등록번호 10-2107914
(24) 등록일자 2020년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/46 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/461 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0169623
(22) 출원일자 2018년12월26일
심사청구일자 2018년12월26일
(56) 선행기술조사문헌
Journal of Life Science 2016 Vol. 26. No. 3. 296~301 [DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2016.26.3.296]
(뒷면에 계속) 기술이전 희망 : **기술양도**

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
박남규
부산광역시 수영구 광안해변로 100, 103동 211호 (남천동, 비치아파트)
고혜진
부산광역시 영도구 절영로93번길 23-3(남항동2가)
오혜영
부산광역시 수영구 수영로408번길 54, 1동 1206호(남천동, 우성보라)
(74) 대리인
위병갑

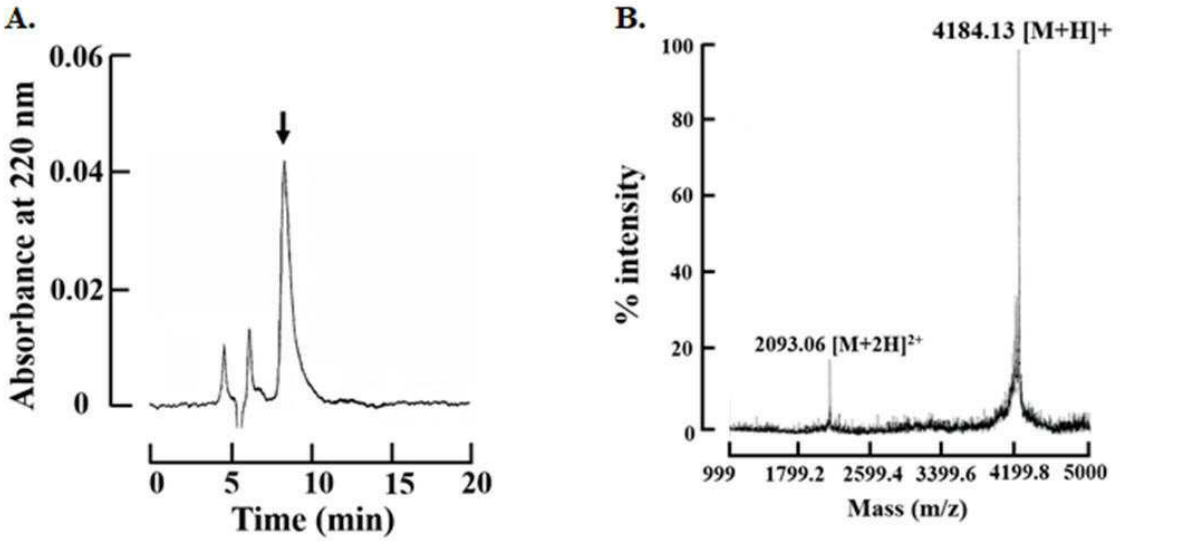
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **메기 껍질로부터 정제된 항균 펩타이드**

(57) 요 약

본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드에 관한 것으로서, 상기 펩타이드는 그람양성균 또는 그람음성균에 대한 항균활성을 가지고 있어 의약 및 식품 분야 등에서 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도3



(56) 선행기술조사문헌

Thesis, Karen Lynn Lohnes, PhD, 2012, Professor Catherine Fenselau, Department of Chemistry and Biochemistry

NCBI Reference Sequence: XP_023151982.1

Fish & Shellfish Immunology VOl. 67 (2017) p. 675-683

KR1019990077430 A

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	18-3-50-54
부처명	환경부
연구관리전문기관	부산녹색환경지원센터
연구사업명	용역연구사업
연구과제명	수산가공폐기물의 자원화 가능성 타진을 위한 기능성 활성 및 유용성 물질 탐색
기 여 율	1/1
주관기관	부경대학교
연구기간	2018.06.15 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 펩타이드는 메기의 껍질에서 정제된 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 펩타이드는 60S 리보솜 단백질(60S ribosomal protein) L27의 C-말단 단편인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 펩타이드는 그람양성균 또는 그람음성균에 대한 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 5

제 1 항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드; 및 상기 펩타이드를 포함하는 항균용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 기존의 항생제에 대한 내성 병원균의 급증으로 인해 이를 대체 할 수 있는 새로운 종류의 항균활성 물질의 개발에 이목이 집중되고 있다(Neu, H.C., Science., 257, 1064-1073, 1992). 그 중 하나로 주목되는 것이 항균활성 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)로, 이는 내성문제 및 면역문제나 거부반응의 문제가 없는 미생물로부터 숙주를 보호하기 위해 자연적으로 생성된 천연 항생물질이다. 항균활성 펩타이드는 생물체의 선천성 면역체계(innate immune system)의 최전방 생체 방어인자로, 특정 미생물이나 항원에 반응하는 후천면역과는 달리 미생물의 종류에 크게 상관없이 작용하며 반응시간도 바로 혹은 몇 시간 내로 매우 빠르다.

[0003] 어류의 부산물과 폐기물인 두부, 내장, 및 껍질은 다양한 종류의 생리활성 물질을 다량 포함하고 있다고 알려져 있다. 이와 같이 폐기되는 부산물들을 이용하여 수산양식에서 발생하는 어류 질병의 조절제 또는 어류 질병 항생제로 사용될 수 있는 새로운 항균활성 펩타이드와 같은 생리활성 물질의 개발을 한다면, 미이용자원인 폐기물로부터 고부가가치를 지닌 신물질을 발견할 수 있는 커다란 성과를 얻을 수 있으리라 생각된다. 그러나, 아직까지 메기의 부산물인 껍질로부터 새로운 기능을 지니는 생리활성 물질 개발에 관한 연구는 그다지 많지 않다. 따라서, 본 연구에서는 메기의 껍질 추출물을 사용하여 항균활성을 나타내는 물질을 정제하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1834884호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드를 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 메기의 껍질에서 정제된 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 60S 리보솜 단백질(60S ribosomal protein) L27의 C-말단 단편인 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 그람양성균 또는 그람음성균에 대한 항균 활성을 가지는 것일 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 항균 펩타이드는 메기의 껍질에서 정제된 60S 리보솜 단백질(60S ribosomal protein) L27의 C-말단 단편으로서, 상기 펩타이드는 그람양성균, 그람음성균 또는 어류 병원성 세균에 대한 항균활성을 가지고 있어, 의약 및 식품 분야 등에서 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 0.6 M의 아세트산암모늄 분획에 대하여, 첫 번째 역상 크로마토그래피(A)를 수행한 결과 및 두 번째 정제 크로마토그래피(B)를 수행한 결과를 나타낸 것이다 (검은색 바(bar): 활성분획을 나타냄).

도 2는 활성분획에 대하여, 세 번째 역상 크로마토그래피(A)를 수행한 결과 및 네 번째 정제 크로마토그래피(B)를 수행한 결과를 나타낸 것이다 (검은색 바(bar) 및 화살표: 활성분획을 나타냄).

도 3은 활성분획의 최종 정제 크로마토그래피(A)를 수행한 결과 및 MALDI TOF mass spectrum(B)를 수행한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 PALKRKARREAKVKFEERYKTGKNKWFFQKLRF(서열번호 1)의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드를 제공한다.

[0019] 본 발명의 항균 펩타이드는 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로만 한정되지 않고, 서열번호 1의 아미노산 서열의 기능적 동등물을 포함할 수 있다.

[0020] 상기 "기능적 동등물"은 펩타이드의 아미노산 부가, 치환 또는 결실로 인해, 상기 항균 펩타이드의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로서, 항균 펩타이드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩타이드를 말한다.

[0021] 본 발명의 항균 펩타이드는 60S 리보솜 단백질(60S ribosomal protein) L27의 C-말단 단편으로서 메기의 껍질에서 정제된 것이지만, 당업계에 알려진 통상의 펩타이드 합성 방법에 의해 제조가 가능하며, 제조 방법에 특별히 한정되지 않는다. 상기 합성 방법은 당업계의 통상적인 펩타이드의 화학적 합성 방법(W. H. Freeman and Co., Proteins; structures and molecular principles (1983))으로 합성하는 것이 바람직하며, 구체적으로는 액상

고상법(Solution Phase Peptide synthesis), 고상 고상법(Solidphase peptide syntheses), 단편 응축법 및 F-moc 또는 T-BOC 화학법으로 합성하는 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로는 액상 고상법(Merrifield, RB., J. Am. Chem. Soc., 85.2149: 196)으로 합성하는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0022] 본 발명에서의 용어, "항균"이란 유해성을 가지는 모든 미생물의 생장 또는 성장을 억제하는 것을 말하며, 상기 미생물은 그람양성균, 그람음성균 또는 어류 병원성 세균일 수 있다.

[0023] 상기 그람양성균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 스타필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 엔테로코커스 페시움(*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 또는 스트렙토코커스 뮤턴스(*Streptococcus mutans*)인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 상기 그람음성균은 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 살로넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 살모넬라 티피머리움(*Salmonella typhimurium*), 쉬겔라 소네이(*Shigella sonnei*), 엔테로박터 클로아세(*Enterobacter cloacae*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 나이세리아 고노리아(*Neisseria gonorrhoeae*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 클로스트리듐 디피실리(*Clostridium difficile*) 또는 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*)인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 상기 어류 병원성 세균은 스트랩토코커스 이니애(*Streptococcus iniae*), 스트렙토코커스 파라우베리스(*Streptococcus parauberis*), 에로모나스 하이드로필라(*Aeromonas Hydrophila*), 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*), 비브리오 앙귈라리움(*Vibrio anguillarium*), 비브리오 캄프벨리(*Vibrio campbellii*), 비브리오 할베이(*Vibrio harveyi*) 또는 비브리오 퍼니시(*Vibrio furnisii*)인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 항균용 조성물은 임상 투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사 또는 근육내주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명의 의약외품 조성물은 상기 항균 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0030] 본 발명의 의약외품 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충진제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충진제일 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 항균 펩타이드 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들이 포함되며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.

[0033] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 본 발명의 펩타이드는 통상적으로 포함되는 화장료 조성물에 0.1 내지 50 중량%, 바람직하게는 1 내지 10 중량%의 양으로 첨가될 수 있다.

[0034] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수(스킨), 영양 화장수(밀크로션), 영양 크림, 맛사지 크림, 에센스, 아이크림, 클렌징 크림, 클렌징 포옴, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0035] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸타, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0038] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라가칸타 등이 이용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 첨가제를 제공한다.

[0041] 본 발명의 식품 첨가제는 상기 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다.

[0042] 상기 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함하며, 특별히 제한되지 않는다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제를 제공한다.

[0044] 본 발명의 사료 첨가제는 분말 또는 액체 상태의 제제 형태일 수 있으며, 사료 첨가용 부형제를 포함할 수 있다. 사료 첨가용 부형제로는 예를 들어, 탄산칼슘, 말분, 제올라이트, 옥분 또는 미강 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명의 사료 첨가제는 단독으로 투여되거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합되어 투여될 수 있다. 또한, 상기 사료 첨가제는 탑 드레싱으로서 또는 이들을 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도로, 별도의 경구 제형으로, 또는 다른 성분과 조합하여 쉽게 투여할 수 있다. 통상적으로, 당업계에 잘 알려진 바와 같이 단독 일일 섭취량 또는 분할 일일 섭취량을 사용할 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] **실시예 1. 실험방법**

[0050] **1.1. 메기(catfish, *Silurus asotus*)의 껍질로부터 기능성 물질 추출 및 분리**

[0051] 본 발명자들은 메기 껍질로부터 기능성 물질을 추출하고자 하였다. 우선, 동결된 메기 170 마리 분의 껍질조직(3.3 kg)을 1차 증류수를 이용하여 10분간 끓인 후 식혔다. 5% 초산을 첨가한 뒤, 조직을 파쇄하였고, 시료를 4℃에서 40분 동안 10,000xg로 원심분리하였다. 침전물은 다시 5% 초산용액을 넣고, homogenizer (PT10-35, KINEMATICA AG, switzerland)로 균질화한 후, 4℃에서 40분 동안 13,000xg로 원심분리하였다. 원심분리된 펠릿(pellet)은 상기 추출과정과 동일한 방법으로 한 번 더 반복하였다. 두 번에 걸쳐 얻어진 상층액은 농축시킨 후, 농축액과 에탄올을 1 : 1로 섞어 -20℃의 냉동고에서 하루 동안 정치하였다. 이후, 4℃에서 40분 동안 13,000xg의 조건으로 원심분리하여 에탄올에 의해 고형화된 고분자 물질을 제거하였다. 상층액을 농축한 후, 한 번 더 3배 분량의 에탄올을 첨가하여 균질화 한 뒤, 동일한 조건으로 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 농축된 상층액(0.4 L)에는 에탄올(1.2 L)과 NaCl 10 g을 첨가하여 반응시킨 뒤, 30분 동안 4℃에서 20,000xg로 원심분리하였다. 이후, 얻어진 상층액을 다시 농축하였다. 농축한 상층액에는 최종 농도가 0.1 N HCl이 되도록 1 N HCl을 첨가하였고, 4℃에서 50분 동안 20,000xg로 원심분리하여 상층액을 얻었다.

[0052] 최종 얻어진 상층액을 부분적으로 물질을 분리하기 위해 Sep-Pak C_{18} cartridge에 주입하였다. 우선 Sep-Pak C_{18} cartridge를 0.1% TFA(Trifluoroacetic acid)가 포함된 100% 메탄올로 활성화시킨 후, 0.1 % TFA가 포함된 H_2O로 충분히 평형화하였다. 충분히 평형화된 cartridge에 시료를 주입하여 0.1% TFA가 포함된 10% 메탄올(retained materials, "RM 10"라 함), 60% 메탄올("RM 60"이라 함) 및 100% 메탄올("RM 100"이라 함)로 물질들을 각각 용출시켜 분리하였다.

[0053] 추출한 시료를 Sep-Pak C_{18} cartridge를 사용하여 용출해 얻은 뒤 동결 건조한 RM 60을 양이온 교환 CM52 cellulose resin(Cat No. 4037-050, Whatman)이 충진된 컬럼(1.8 × 27 cm)에 주입하여 순차적인 방법으로 다음과 같이 분리하였다. 준비된 컬럼에 1.5 M 아세트산암모늄(Ammonium acetate)을 100 ml 정도 흘려 레진(resin)을 씻은 뒤, 0.02 M 아세트산암모늄을 300 ml 정도 천천히 흘려 평형화하였다. 동결 건조된 활성분획 RM 60은 0.02 M 아세트산암모늄(pH 5.15)에 녹여 컬럼(column)에 주입하였다. 시료가 결합된 컬럼 내에 0.02 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M 및 1.5 M 아세트산암모늄(pH 5.15)으로 제조된 용매를 순차적으로 각각 148 ml씩 흘려주어 분획화하였다. 이들 분획들을 Sep-pak C_{18} cartridge에 각각 주입하여 0.1% TFA를 포함한 D.W.와 100% 메탄올(RM 100)을 사용하여 분획 내의 염을 제거하여 농축한 뒤 이들의 활성을 탐색하였다.

[0055] **1.2. 항균활성 분획으로부터 항균성 펩타이드의 정제**

[0056] 첫 번째 HPLC 정제과정으로 동결 건조된 0.6 M 아세트산암모늄에서 용출된 활성분획을 Vydac 210TP510 Protein & peptide C_{18} (9.2 × 250 mm, 5㎛, Grace Vydac, USA) 역상컬럼을 사용하여 100분동안 0 → 10 % (10 min), 10 → 60 % CH_3CN/0.1% TFA (pH 2.2)의 농도구배조건으로 유속 3.0 ml/min으로 분리하여 2분당 1분획씩 분획화하였다.

[0057] 두 번째 정제과정으로 Vydac 218TP54 Protein & peptide C_{18} (4.6 × 250 mm, 5 ㎛, Grace Vydac, USA) 역상컬럼을 사용하여 유속 0.5 mL/min으로 60분동안 15 → 45 % CH_3CN/0.1% TFA(pH2.2) 분리하였으며, 220 nm에서 물질을 검출하였다. 동일컬럼을 사용하여 유속 1.0 mL/min으로 50분 동안 25 → 35 % CH_3CN/0.1% TFA의 조건으로 세 번째 정제과정을 거친 뒤, 활성분획을 다른 역상컬럼인 Capcellpak C_{18} (4.6 × 250 mm, 5 ㎛, Shiseido, Japan) 컬럼에 주입하여 5 → 65 % CH_3CN/0.1 % TFA (60 min)의 조건에서 유속 1.0 mL/min으로 분리하였다.

[0058] 마지막 정제 단계로 Capcellpak C_{18} 컬럼을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 0.1 % TFA를 포함한 28% CH_3CN (pH 2.2)의 isocratic 조건으로 정제하였다.

[0060] **1.3. 정제된 물질의 일차구조 서열 해석**

[0061] 정제한 펩타이드의 분자량 측정은 MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager-DE™ PRO spectrometer, Perseptive Biosystems, USA)를 사용하였으며, matrix는 α-cyano-4-hydroxycinamic acid를 사용해 측정하였다. Edman degradation 법을 적용한 Amino Acid Sequential Analyzer (PPSQ-33A, JASCO, JAPAN)를 이용하여 정제된 활성물질의 일차구조를 분석하였다. 얻어진 일차구조를 기초로 하여 알려진 물질들과의 유사성을 알아보기 위해, NCBI의 BLAST (http:// blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi)를 통해 정제된 물질의 분석된 일차구조를 기준으로 검색하여 상동성 검사를 하였다.

[0063] **1.4. 항균활성 측정**

[0064] 정제과정 중 및 정제된 물질에 대한 항균활성을 측정하기 위해 URDA(ultrasensitive radial diffusion assay)를 수행하였으며, 정제 중에는 그람음성균인 *Escherichia coli* D31 (*E. coli* D31)을 사용하였다.

[0065] 또한, 정제된 물질의 경우, 그람양성균인 *Bacillus subtilis* KCTC1021, *Staphylococcus aureus* KCTC1621, *Micrococcus luteus* KCTC1071, 그람 음성균인 *Escherichia coli* D31, *Salmonella enterica* ATCC13311, *Shigella sonnei* KCTC2009, *Enterobacter cloace* KCTC1685, *Psudomonas aeruginosa* KCTC2004, *Klebsiela pneumoniae* KCTC2208, 어류 병원성 세균(어병세균)인 *Streptococcus iniae* FP5228, *Aeromonas hydrophila* KCTC2358에 대한 농도별 항균활성을 측정하여 MEC(minimum effective concentration, 최소효과농도, ㎍/㎖) 값을 산출하였다. 먼저 테스트할 균액을 TSA (tryptic soy agar) plate에 도말하여 배양온도(어병세균: 25℃; 그람양성균 및 그람음성균: 37℃)에서 16~18시간 동안 배양하였다. 완전히 분리되어 있는 하나의 집락(colony)를

따서 4 ml의 TSB(triptic soy broth)에 접종하여 다시 37℃에서 mid-logarithmic phase까지 전배양하였다. 배양한 균액을 멸균된 no agarose under layer medium을 이용하여 ~10^8 CFU/mL 세균수에 해당하는 McFarland turbidity standard가 0.5 (Vitek Colorimeter #52-1210, Hach, Loveland, Colorado)가 되도록 희석하였다. 9.5 ml의 under layer medium gel [10 mM 인산 완충액(pH 6.57), 0.03% TSB(tryptic soy broth) 및 1% low EEO agar]에 500 μl 희석균액을 섞어 세균수가 5 ×10^6 CFU/mL 정도가 되도록 희석한 배지를 사각 플레이트(직경 10cm, 높이 1.5 cm)에 분주하여 높이 1 mm 높이의 겔이 형성되도록 굳혔다. 굳힌 배지에 직경 2.5 mm의 웰(well)을 만들었다. 추출물 또는 정제된 활성물질을 각각 5 ㎕ HAc(0.01% HAc)에 녹여, 각 웰에 첨가한 후, 3시간 동안 배양하였다. 10 mM PBS (pH 6.57)에 6% TSB, 및 1% 한천을 포함하는 두 배 농도의 overlayer gel medium 10 ml을 under layer gel 위에 부어 굳힌 뒤 배양온도에서 16~18시간 동안 배양한 뒤, 웰(well) 주위로 생성된 투명환(clear zone)의 직경을 측정하였다. 웰의 투명환(clear zone)의 직경에서 웰의 직경을 제한한 값을 유니트(U)로 환산하였고, 활성물질의 MEC 값은 펩타이드 농도의 로그값에 대한 유니트의 곡선의 X-절편(intercept)으로 계산하였다(Zhao et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy,45: 2695-2702, 2001).

[0066] 정제된 물질에 대한 pH 및 온도의 효과를 조사하기 위해, 그람음성균인 *E. Coli* D31과 그람 양성균인 *Bacillus subtilis* KCTC1021으로 항균활성을 비교하였다. pH 효과를 측정하기 위해, 정제된 물질을 0.01% 초산 (pH 3), 증류수 (pH 7) 및 0.01% NaOH (pH 10) 용액에 1시간 동안 배양한 뒤, URDA 법으로 활성을 측정하였다. 또한, 온도 안정성을 측정하기 위해, 정제된 물질을 100℃에서 10분간 처리한 뒤, 쿨링시켜 URDA 법으로 비 처리군과 함께 활성을 측정하여 비교하였다.

[0068] **실시예 2. 메기의 껍질로부터 유용성 물질의 추출 및 생리활성 측정**

[0069] **2.1. 정제과정 중 항균활성 측정**

[0070] 메기의 껍질을 5% 초산추출법으로 추출하여 얻어진 추출액을 Sep-Pak C_{18} 카트리지를 이용하여 F.T.(Flow through), 0.1% TFA가 포함된 10% 메탄올(RM 10), 60% 메탄올(RM 60) 및 100% 메탄올(RM 100)의 분획으로 부분 분리하였다. 이후, 상기 분획들의 각 부피의 1/1,000에 해당하는 양의 농도에서 URDA 법을 수행하여 *E. coli* D31에 대한 항균활성을 측정하였다. 각 분획에 따른 항균활성 결과는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0072]

분획	F.T.	RM 10	RM 60	RM 100
투명환 크기 (mm)	no activity	16	24	16

[0074] 표 1에서와 같이, RM 10, RM 60 및 RM 100 분획에서는 유의할 만한 항균활성이 나타났으며, 특히, RM 60에서 24 mm의 가장 큰 투명환(clear zone)이 나타났음을 확인하였다. 그러나, C18 카트리지에 결합되지 않고 바로 용출된 F.T. 분획에서는 활성이 나타나지 않았다.

[0076] 이후, 활성이 가장 큰 RM 60 분획을 양이온 컬럼인 CM52를 사용하여 0.02 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M 및 1.5 M 농도의 아세트산암모늄 (pH 5.15) 용액으로 다시 분획화 하였으며, 각 분획의 1/500에 해당하는 양을 사용하여 항균활성을 측정하였다. 아세트산암모늄의 각 농도에 따른 항균활성에 대한 결과는 하기 표 2와 같다.

표 2

[0078]

분획	Ammonium actate 농도						
	0.02 M	0.2 M	0.4 M	0.6 M	0.8 M	1.0 M	1.5 M
투명환 크기 (mm)	27	23	15	16	10	no activity	no activity

[0080] 표 2에서와 같이, 0.02 M ~ 0.8 M의 아세트산암모늄 분획에서는 *E. coli* D31에 대한 항균활성이 나타났으나, 1.0 M 및 1.5 M의 아세트산암모늄 분획에서는 어떠한 활성이 나타나지 않았다. 0.02 M 및 0.2 M의 아세트산암모늄 분획에서는 다른 농도에서 보다 큰 활성을 보였다. 그러나, 상기 0.02 M 및 0.2 M의 분획들에서는 컬럼의 양이온 교환 레진과 거의 반응하지 않거나 약한 결합을 하는 것으로 확인되어, 염, 아민성 물질, 다이펩타이드(dipeptide) 또는 트리펩타이드(tripeptide)와 같은 저분자량의 펩타이드나 negative net charge를 지니는 펩

타이드들이 포함되어 있는 것으로 판단되었다.

[0081] 일반적으로 항균활성 펩타이드는 positive net charge를 띠는 성질을 가지고 있기 때문에, 본 발명에서는 항균활성 펩타이드를 정제하기 위해 세 번째로 반응이 큰 0.6 M의 아세트산암모늄 분획을 사용하였다.

[0083] **2.2. 활성분획으로부터 항균활성 펩타이드 정제**

[0084] 본 발명자들은 상기 2.1.에서와 같이 0.1% TFA가 포함된 60% 메탄올(RM 60)로 부분분리된 분획을 양이온 교환 레진인 CM52를 사용하여 분획하였고, 이중 0.6 M 아세트산암모늄 분획을 HPLC를 이용하여 항균활성 펩타이드를 정제하고자 하였다.

[0085] 첫 번째 단계로 분취용 Vydac 210TP510 C_{18} column을 사용하여 분리한 결과, 27 ~ 36% CH_3CN의 농도에서 활성분획이 용출되었다 (도 1A, black bar). 또한, 두 번째 단계로 분석용 Vydac 218TP54 C_{18} column을 사용하여 정제한 결과, 25 ~ 28% CH_3CN의 농도에서 용출된 분획에서 항균활성을 나타내었다 (도 1B, black bar).

[0086] 농축된 활성분획은 두 번째 정제과정과 동일한 컬럼 내에 주입하여 CH_3CN의 농도를 5분당 1% 씩 증가시키는 농도구배조건을 적용시켜 분리한 뒤 약 28% CH_3CN에서 활성분획을 얻었다 (도 2A). 얻어진 활성분획을 다른 역상 컬럼인 Capcellpak C_{18} column (4.6 × 250 mm)에 1 %/1 min의 농도구배를 적용시킨 결과 약 28.6% CH_3CN에서 하나의 peak를 분리하였다 (도 2B).

[0087] 마지막으로 활성분획을 28% CH_3CN/0.1% TFA로 평형화된 Capcellpak C_{18} column에 주입하여 isocratic 조건에서 분리한 결과, 순수한 하나의 피크(peak)로 정제되었다 (도 3A). 최종 정제된 활성분획은 MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager-DE™ PRO spectrometer, Perseptive Biosystems, USA)를 사용하여 분자량을 측정한 결과, 4184.13 $[M+H]^+$의 물질임을 확인하였다 (도 3B).

[0089] **2.3. 정제된 항균활성 펩타이드의 일차구조 및 상동성 검사**

[0090] 정제된 4184.13 $[M+H]^+$의 물질에 대한 일차구조 분석을 위해, Edman degradation 법에 의해 N-terminal sequencing을 수행하였고, 29개의 아미노산으로 분석되었으며, 아미노산 서열은 다음과 같다: Amino acdi(pmol); Pro(4.01)-Ala(4.13)-Leu(3.72)-Lys(1.48)-Arg(1.97)-Lys(1.18)-Ala(2.93)-Arg(2.12)-Arg(2.00)-Glu^{10}(1.66)-Ala(2.03)-Lys(0.90)-Val(2.20)-Lys(0.91)-Phe(1.86)-Glu(1.32)-Xaa-Arg(1.23)-Tyr(1.27)-Xaa^{20}-Thr(1.03)-Gly(0.95)-Xaa-Asn(1.10)-Xaa-Xaa- Phe(1.00)-Phe(0.99)-Gln^{29}(0.92). 이들 중 Xaa은 정확히 분석되지 않은 아미노산을 나타낸다. 상기 분석된 아미노산으로 이루어진 펩타이드에 대한 분자량의 이론값(average)은 3498.09로서, 측정된 분자량(4184.13)과 686.05 Da의 차이가 났다.

[0091] 분석된 일차서열을 Query로 하여 NCBI(National Center for Biotechnology information) 내의 BLAST (Basic Local alignment search tool, http:// blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi)에서 Protein BLAST를 수행하였다. 정제된 항균활성 펩타이드와 기존 단백질간의 상동성 검사 결과는 하기 표 3과 같다.

표 3

[0093]

Primary structure	Organisms	Identity(%)
PALKRKARREAKVKFEXRYXTGXNXXFFQ ----	*Silurus asotus_in this study*	82
PALKRKARREAKVKFEERYKTGKNKWFFQKLRF	*Homo sapiens*_Human	82
PALKRKARREAKVKFEERYKTGKNKWFFQKLRF	*Geospiza fortis*_ bird	82
PALKRKARREAKVKFEERYKTGKNKWFFQKLRF	*Mus musculus*_rat	82
PALKRKARREAKVKFEERYKTGKNKWFFQKLRF	*Callorhinchus milii*_Shark	82
PALKRKARREAKVKFEERYKTGKNKWFFQKLRF	*Notothenia coriiceps_Black rockcod*	82
PALKRKARREAKVKFEERYKTGKNKWFFQKLRF	*Oreochromis niloticus*_Nile tilapia	82
PALKRKARREAKVKFEERYKTGKNKWFFQKLRF	*Ictalurus punctatus*_Channel catfish	82

[0095] 그 결과, 정제된 항균활성 펩타이드는 60S ribosomal protein L27의 C 말단과 82% Identity를 나타내었으나

(표 3), 이는 분석되지 않은 Xaa에 의한 것이었다. 각 Xaa 위치의 아미노산과 일차구조 분석 시 분석되지 않았던 C-말단의 "KLRF" 잔기를 포함하여 분자량을 계산한 결과, 분자량이 4185.98 Da으로서, 이는 정제된 항균활성 펩타이드의 분자량과 일치하였다.

[0096] 따라서, 정제된 항균활성 펩타이드의 일차서열은 PALKRKARRE^{10}AKVKFEERYK^{20}TGKNKWFFQK^{30}LRF (서열번호 1)이며, 60S ribosomal protein L27의 C-말단 fragment 임을 알 수 있었다.

[0098] **실시예 3. 메기 껍질로부터 정제된 항균활성 펩타이드의 MEC(Minimum Effect Concentration) 측정**

[0099] 본 발명자들은 메기 껍질로부터 정제된 펩타이드의 항균활성 효과를 알아보기 위해, 그람양성균, 그람음성균 및 어병세균에 대한 MEC 값을 측정하였다. 각 균주에 대한 MEC 값은 하기 표 4와 같다. 그 결과, 그람양성균, 그람음성균 및 어병세균에 대한 항균활성이 확인되어, 정제된 펩타이드는 넓은 영역의 항균활성 효과가 있음을 확인하였다.

[0100]

표 4

[0101]

Strains	Gram	MEC (μg/ml)
B. subtilils KCTC1021	+	7.46
S. aureus KCTC1621		7.94
M. luteus KCTC1071		11.07
E. coli D31	-	5.07
S. enterica ATCC13311		8.07
S. sonnei KCTC2009		7.26
E. cloace KCTC1685		6.93
P. aerugonosa KCTC2004		8.22
K. pneumoniae KCTC2208		7.15
S. inniae FP5228	+	9.05
A. hydrophilla KCTC2358	-	8.65

[0103] 또한, 본 발명자들은 정제된 펩타이드에 대한 항균활성 효과가 pH 및 온도에 영향을 받는지 확인하는 실험을 수행하였다. pH 및 온도 조건을 달리하여 그람양성균인 *B. subtilis* KCTC1021 및 그람음성균인 *E. Coli* D31에 따른 항균활성을 측정한 결과는 하기 표 5와 같다.

표 5

[0105]

Strains	투명환 크기 (mm)				
	pH 효과			heat 효과	
	pH3	pH 7	pH 10	가열	비가열
B. subtilis KCTC1021	8.3	8.9	7.4	8.4	8.1
E. coli D31	10.6	10.9	9.7	10.5	10.6

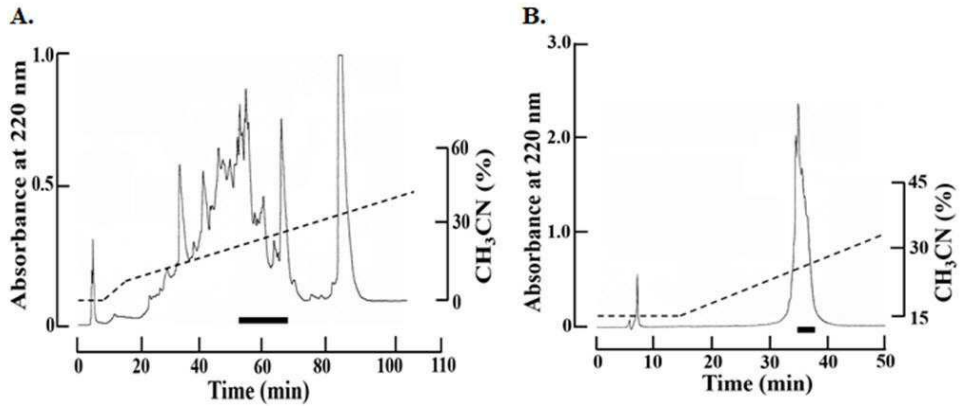
[0107] 표 5에서와 같이, 정제된 펩타이드는 중성조건(pH 7)보다 알칼리조건(pH 10)에서 *B. subtilils* KCTC1021 및 *E. coli* D31에 대한 항균활성이 각각 16.85%, 11% 정도 감소하였고, 산성조건(pH 3)에서는 각각 6.74%, 2.75% 정도 작게 나타났다. 즉, 중성조건(pH 7)에서 가장 항균활성이 좋았고, 산성조건이 알칼리조건보다 활성에 덜 영향을 주었으나, 그 차이는 크지 않음을 확인하였다.

[0108] 또한, 정제된 펩타이드를 가열 또는 비가열 후, *subtilils* KCTC1021 및 *E. coli* D31에 대한 항균활성을 측정하였으나, 항균활성의 차이는 거의 나타나지 않았음을 확인하였다. 이로써, 정제된 펩타이드는 항균활성에 있어 pH 및 온도에 따른 영향을 받지 않음을 확인하였다.

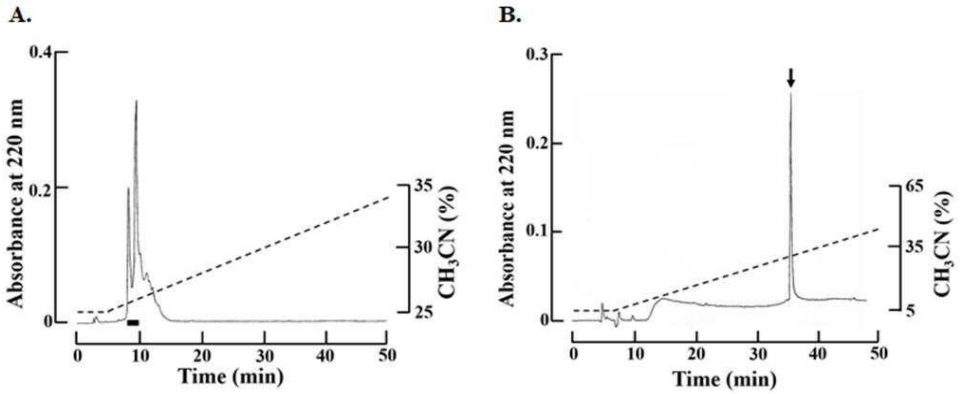
[0110] 상기와 같이, 본 발명자들은 메기 껍질로부터 항균활성이 있는 펩타이드 (PALKRKARRE^{10}AKVKFEERYK^{20}TGKNKWFFQK^{30}LRF)를 정제하였고, 그람양성균, 그람음성균 및 어류 병원성 세균에 대한 항균활성이 있음을 확인하였다.

도면

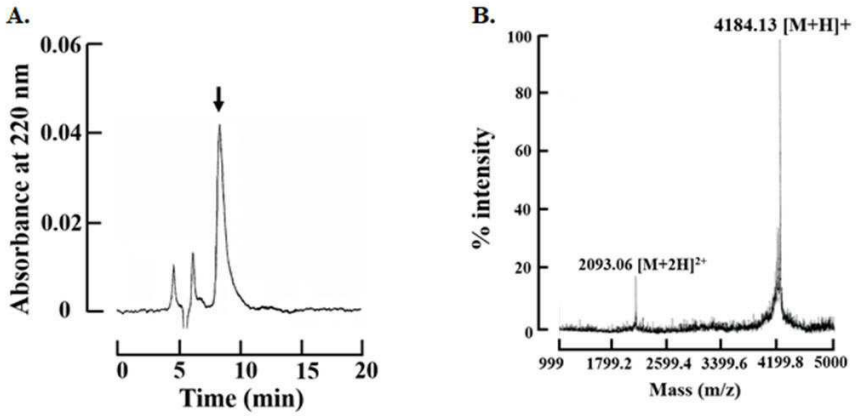
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Antibacterial peptide purified from the skin of Catfish Silurus asotus

<130> PN1812-541

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibacterial peptide_60S ribosomal protein L27 C-terminal fragment

<400> 1

Pro Ala Leu Lys Arg Lys Ala Arg Arg Glu Ala Lys Val Lys Phe Glu
1 5 10 15

Glu Arg Tyr Lys Thr Gly Lys Asn Lys Trp Phe Phe Gln Lys Leu Arg
20 25 30

Phe