(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0080866
(43) 공개일자 2017년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) *A23K 20/195* (2016.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/43595 (2013.01)
A23K 20/195 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2015-0190269
(22) 출원일자 2015년12월30일
심사청구일자 2015년12월30일
기술이전 희망 : **기술양도**

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
박남규
부산광역시 수영구 광안해변로 100, 212동 606호 (남천동, 삼익비치아파트)
이예진
부산광역시 부산진구 당감로 79, 10동 1205호(부암3동, 삼성래미안아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

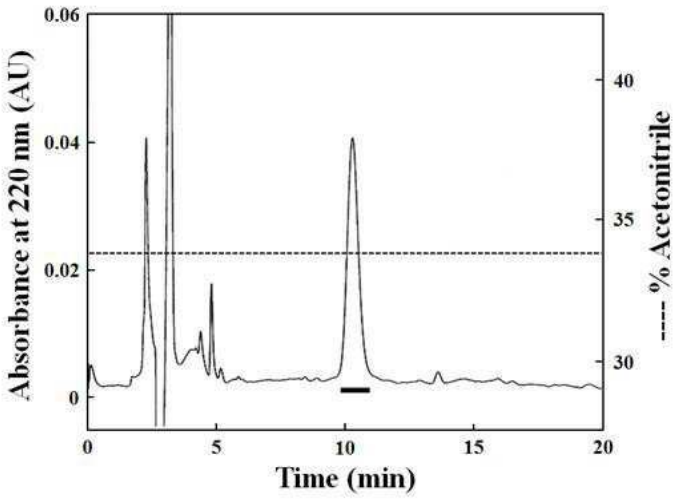
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **민가죽해변 말미잘의 체강액 유래 항균활성 펩타이드 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 말미잘을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물에 관한 것으로, 민가죽해변 말미잘의 체강액으로부터 항균활성 펩타이드는 생물학적 활성도가 높으며 활성 작용범위가 넓은 새로운 항균활성 펩타이드 SAn1를 제공한다. 본 발명에 따른 상기 항균 펩타이드인 SAn1은 그람 양성 및 음성 균주에 높은 항균활성을 지니기 때문에 의약 및 생물산업에 있어 신약 개발의 선도 물질 및 후보물질로서 사용할 수 있는 이점이 있다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

고혜진

부산광역시 영도구 남항동 2가 224번지

김찬희

부산광역시 동래구 명륜로75번길 31 가동 502호 (수안동,새동래아파트)

오혜영

부산광역시 수영구 수영로408번길 54, 101동 1206호(남천동, 우성보라아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013000130002
부처명	환경부
연구관리전문기관	한국환경산업기술원
연구사업명	환경산업선진화기술개발사업
연구과제명	연안생태계 균형유지를 위한 무척추동물 고부가가치물질 활용기술개발
기 여 율	1/1
주관기관	부경대학교 산학협력단
연구기간	2015.04.01 ~ 2016.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

항균활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 말미잘(*Urticina crassicornis*) 체강액으로부터 유래한 펩타이드.

청구항 3

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

그람 음성균, 그람 양성균 및 효모에 대한 항균활성을 갖는 항균 조성물.

청구항 5

제3항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 항균 사료 첨가제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항균활성 펩타이드에 관한 것으로서, 더 상세하게는 민가죽해변 말미잘(*Urticina crassicornis*) 체강액 유래의 새로운 항균활성 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근, 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, 10641073, 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] 항균 또는 항미생물성 펩타이드는 생물체의 선천성 면역체계(innate immune system)의 최전방 생체 방어인자이다. 항미생물성 펩타이드는 특정 미생물이나 항원에 반응하는 후천면역과는 달리 미생물의 종류에 크게 상관없이 작용하며 반응시간도 바로 혹은 몇 시간 내로 매우 빠르다. 내성균의 문제를 항상 내포하고 있는 기존의 항생제와 구분되어 내성의 문제 또는 면역문제나 거부반응의 문제없이 광범위한 생물계에서 미생물로부터 숙주를 보호하기 위해 자연적으로 생성되었기에 이들 항미생물성 펩타이드들은 천연 항생제라고 불린다.

[0004] 또한, 실제로 항균 펩타이드는 기존의 항생제보다 넓은 범위의 미생물에 대하여 강한 항균력을 나타내고 있으며, 항생제 내성을 유발시키는 기존의 항생제와는 다른 활성기작으로 항균 활성을 나타내는 특징을 보임에 따라 항균 활성이 우수한 신규한 항균 펩타이드에 대한 연구가 강하게 대두되고 있다.

[0005] 해양 무척추동물의 대부분은 외부침입에 대한 방어수단으로서 선천성 면역에 의존하고 있으며, 성게(Li, C., Dev. Comp. Immunol., 32, 1430-1440, 2008), 꽃게(Noga, E.J., Dev. Comp. Immunol., 35, 409415, 2011), 멍게(Lee, I.H., J Pept Res., 58, 445-456, 2001), 굴(Defer, D., Fish. Shellfish. Immunol., 34, 1439-1447, 2013), 홍합(Liao, Z., Fish. Shellfish. Immunol., 34, 610-616, 2013),군소 (Iijima, R., Dev. Comp.

Immunol., 27, 305-311, 2003), 갯지렁이(Pan, W., J. Biochem., 135, 297-304, 2004) 등에서 항균활성 펩타이드의 정제가 보고된 바 있다.

[0006] 해양 무척추동물 중 말미잘(sea anemone)은 자포동물문에 해당하며, 먹이를 잡아먹거나 천적으로부터의 보호를 위해 사용되는 '자포'를 지니고 있는 것이 특징이다. 말미잘은 풍부하고 다양한 생리활성물질을 지니고 있는 생물체로, 세포용해성 펩타이드 혹은 단백질(Anderluh, G., Toxicon., 40, 111-124, 2002), 포스포리파아제 A2(Romero, L., Biochimie., 92, 1063-1071, 2010), 산 감지 이온 채널 억제제(Osmakov, D.I., J. Biol. Chem., 288, 23116-23127, 2013), 채널독소(Zaharenko, A.J., Toxicon., 51, 1303-1307, 2008), 단백질 가수분해효소 억제제(Minagawa, S., Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., 150, 240-245, 2008) 등의 물질이 보고된 바 있다.

[0007] 2011년, 두 종류의 말미잘(Stichodactyla mertensii, Stichodactyla gigantea) 추출물로부터 항균활성의 보고가 있으며(Thangaraj, S., Asian. Pac. J. Trop. Biomed.,1, S41-S46, 2011), 상기 나열한 바와 같이 말미잘로부터 다양한 생리활성물질이 보고 되고 있지만 아직까지 말미잘유래 항균활성 펩타이드에 관련된 연구는 미흡한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1211652호

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1211972호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명자들은 항균 활성이 우수한 신규한 펩타이드를 말미잘의 체강액으로부터 간단한 정제과정을 이용하여 분리 및 동정함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 항균 활성이 우수한 신규한 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 신규한 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 항균 사료 첨가제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 항균 펩타이드를 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 말미잘 체강액으로부터 분리 및 정제된 것일 수 있다.

[0015] 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 그람 음성균, 그람 양성균 및 효모에 대한 항균 활성을 갖는 것일 수 있다.

[0017] 나아가 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균 사료 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 민가죽해변 말미잘(*Urticina crassicornis*) 추출물은 항균 활성을 나타내어, 본 발명에 따른 민가죽해변 말미잘(*Urticina crassicornis*)추출물은 항균력이 우수한 사료 첨가제 제조에 사용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 말미잘 체강액 추출물의 *B. subtilis* KCTC1021 및 *E. coli* D31에 대한 항균 활성을 URDA법을 이용하여

확인한 사진이다.

도 2는 말미잘 체강액 추출물의 역상 HPLC 크로마토그램 및 이로부터 분리된 활성분획의 항균활성을 URDA법을 이용하여 확인한 사진(상기 HPLC 히스토그램 중앙)이다.

도 3은 본 발명의 일 실시 예에 따른 최종 정제된 항균활성 펩타이드에 대한 역상 HPLC 크로마토그램이다.

도 4는 상기 도 2의 정제된 펩타이드 분획의 트립신 처리 전·후 항균활성을 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis KCTC1021) 균주에 대하여 URDA법을 이용하여 확인한 사진이다.

도 5는 상기 도 2의 정제된 펩타이드 분획을 AU-PAGE를 수행 한 후 쿠마시 염색용액(Coomassie brilliant blue R-250 dye)으로 염색을 한 사진이다.

도 6은 상기 도 2의 정제된 펩타이드 분획을 MALDI time-of-flight(TOF)/TOF 질량분석기를 이용하여 분자량을 분석한 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시 예에 따른 최종 정제된 항균활성 펩타이드를 에드만 분해법(Edman degradation)을 통해 분석한 서열번호 1의 아미노산 서열이다.

도 8은 본 발명의 일실시예를 통해 확인된 항균활성 펩타이드 SAn1과 기존에 본 실험실에서 보고한 항균활성 펩타이드 SAn4를 함께 나열하여 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 항균 활성이 우수한 신규한 펩타이드를 제공함에 그 특징이 있으며, 바람직하게는 서열번호 1로 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 항균 펩타이드를 제공함에 그 특징이 있다.

[0021] 본 발명자들은 종래의 연구된 항균 펩타이드 이 외에 새로운 항균 펩타이드를 찾기 위해 민가죽해변 말미잘(*Urticina crassicornis*)로부터 신규한 항균 펩타이드를 분리하였다.

[0022] 말미잘은 바다에서 살며 대부분이 암석에 착생하고 다른 동물이나 모래진흙 속의 돌이나 조가비에 붙는 것들도 있으며, 어떤 것은 떠다니기도 한다. 착생하는 것도 조건에 따라 이동할 수 있다. 몸은 원통형이며 위쪽에 입이 열려 있고 항문은 없다. 몸은 골격이 없이 말랑말랑하고 체벽의 근육은 발달하였다. 입 주위는 여러 개의 촉수가 나 있고, 체벽의 안쪽에는 격막(隔膜)이 붙어 있다. 크기는 5~10㎜에서 60~70㎜까지 다양하다. 플랑크톤을 비롯하여 작은 물고기·새우·게 등 동물질이 촉수에 닿으면 무엇이든지 먹는다. 촉수에는 독물질이 들어 있는 자세포(刺細胞)가 많이 있어 촉수에 닿은 먹이를 자세포 속에 간직하고 있던 자사로 찔러 마취시킨다. 소화관은 없고, 몸 속의 빈곳을 위강(胃腔)이라 하며 여기서 먹이를 소화하고 찌꺼기는 입을 통하여 밖으로 내보낸다. 체벽과 촉수는 신축성이 매우 높아 건드리면 촉수와 체벽을 심하게 움추린다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 용어 “민가죽해변 말미잘(*Urticina crassicornis*)”은 환태평양 연안에 주로 분포하고 있으며 조간대 및 조하대 상부에 서식하는 말미잘로, 너비 1 ~ 7.6 cm까지 자라며 녹색, 적색 및 갈색 등 다양한 색상을 가지고 있다. 최대 수명 80년의 독립적으로 생활하는 개체이다.

[0024] 또한 국내에서 유일하게 식용되고 있는 말미잘이며 예로부터 부산 기장군에서 어부 및 해녀들이 보양을 위해 먹었던 말미잘 매운탕은 아직까지도 일반인들이 즐겨 찾는 보양식 중의 하나로 알려져 있다.

[0025] 최근, 일부 말미잘 추출물로부터 항균활성을 확인한 바가 있지만, 항균활성을 갖는 단일 성분에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 또한 추출물로부터 단일 성분을 분리하는 과정은 분리시 소요되는 시간이 길며, 획득율이 낮고, 천연물이 가질지도 모르는 잠재적 독성 등의 요인들로 인해 균일한 효과 및 규격화를 기대하기가 어렵고, 추출물로부터 단일 성분을 분리하기까지 과정이 복잡하다는 단점이 있다.

[0026] 이에 본 발명자들은 민가죽해변 말미잘의 체강액으로부터 항균 활성을 가지는 단백질을 분리 및 동정하였고, 그 아미노산 서열을 시퀀싱 분석을 통해 규명하였는데, 총 38개 아미노산으로 구성된 GGIPCSCKDESGIYWFGRYKCSGYRETCASIFGVCCVR(서열번호 1) 펩타이드임을 확인하였고, 상기 펩타이드를 “SAn1”으로 명명하였다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "이황화 결합(disulfide bonds)"은 두 개의 유황원소(-S-S-) 사이의 단일 결합으로 생화학에서는 두 단백질간 시스테인(cysteine)잔기 사이나 혹은 한 단백질 내의 두 시스테인 잔기 사이에 형성되는 유황원소 결합을 지칭하며, 단백질의 2차3차 구조를 결정하는 데 중요한 역할을 한다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어 “SAn1”은 민가죽해변 말미잘(*Urticina crassicornis*)의 체강액(coelomic fluid) 추출물로부터 정제된 분자량 4194.345 Da 및 등전점(pI) 8.32를 나타내는 항균활성 펩타이드를 말한다.

[0029] 따라서 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 신규한 항균 활성을 갖는 펩타이드를 제공할 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 상기 SAn1 펩타이드를 수득하는 방법은 천연으로부터 분리 및 정제하거나 또는 당업계에 공지된 화학적 합성법을 통해 합성할 수 있다. 바람직하게는 민가죽해변 말미잘로부터 분리할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 민가죽해변 말미잘의 체강액으로부터 추출물을 획득한 후, 상기 추출물로부터 분리 및 정제할 수 있다.

[0031] 천연으로부터 SAn1 펩타이드를 추출하는 방법은 당업계에 공지된 단백질 추출방법이라면 모두 사용할 수 있으며, 단백질의 활성 및 구조가 변형되지 않는 조건 하에서 수행할 수 있다.

[0032] 또한, 천연으로부터 추출된 추출물로부터 본 발명의 SAn1 펩타이드의 분리 및 정제는 실리카겔(silica gel)이나 활성 알루미나(alumina) 등의 각종 합성 수지를 충진한 컬럼 크로마토그래피(column chromatography), 여과(filtration) 및 고속액체크로마토그래피(HPLC) 등을 단독으로 혹은 병행하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 역상 고속액체크로마토그래피(RP-HPLC, reverse phase-high performance liquid chromatography)를 두 단계로 하여 수행함으로써 분리할 수 있고, 상기의 과정을 거친 분리물을 최종 정제할 수 있다. 그러나 SAn1 펩타이드의 추출 및 분리정제 방법은 반드시 상기한 방법에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 한편, 본 발명자들은 민가죽해변 말미잘의 체강액 유래 추출물 및 상기 추출물을 분리 정제한 펩타이드가 항균활성이 있는지를 확인하기 위하여 그람 양성균(바실러스 서브틸리스) 및 그람 음성균 (에스케리시아 콜라이)을 대상으로 상기 추출물을 처리한 후, 이들의 직경을 관찰한 결과, 민가죽해변 말미잘의 추출물이 그람 양성 및 음성균에 대해 모두 항균활성을 보이는 것으로 확인하였다.

[0034] 이에 본 발명자들은 본 발명의 일실시예에서, 민가죽해변 말미잘 체강액 유래 항균 활성 펩타이드가 단백질성을 가지는 물질인지를 확인하기 위해, 펩타이드에 단백질 분해효소인 트립신을 처리하였고 이를 그람 양성균인 *B. subtilis*에 대한 항균 활성을 측정하였다. 그 결과, 항균 활성이 현저히 감소된 것을 확인하였다(도 4 참조).

[0035] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 민가죽해변 말미잘 체강액 유래 추출물 속에 항균 활성을 가지는 유효성분은 단백질성을 갖는 물질이라는 것을 알 수 있었고, 앞서 기술한 바와 같이 상기 추출물로부터 단백질을 분리 및 정제하는 방법을 통해 SAn1 펩타이드를 동정하게 되었다.

[0036] 그러므로 본 발명은 서열번호 1로 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 항균 펩타이드를 제공할 수 있다.

[0037] 또한 본 발명에서 상기 “항균”이란, 유해성을 가지는 모든 미생물의 생장 또는 성장을 억제하는 것을 말하며, 본 발명에서 상기 미생물은 그람 양성균, 그람 음성균 및 효모일 수 있다.

[0038] 상기 그람 양성균의 종류로는 이에 제한되지는 않으나, 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 스타필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 및 스트렙토코커스 이니에(Streptococcus iniae)일 수 있으며, 상기 그람 음성균은 에어로모나스 하이드로필라(Aeromonas hydrophila), 에스케리시아 콜라이(Escherichia coli), 슈도모나스 에루지노사(Pseudomonas aeruginosa), 살모넬라 엔테리카(Salmonella enterica), 시겔라 소네이(Sigella sonnei), 및 비브리오 파라헤모라이티쿠스(Vibrio parahaemolyticus) 일 수 있으며, 및 상기 효모는 칸디다 알비칸스(Candida albicans)일 수 있다.

[0039] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 발명의 신규 펩타이드인 SAn1은 탁월한 항균 활성을 가질 뿐만 아니라 안전한 항균 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0040] 그러므로 본 발명은 본 발명에 따른 상기 SAn1 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공할 수 있다.

[0041] 상기 항균 조성물에 있어서, 본 발명의 일실시예에 따른 펩타이드를 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.1 내지 50 중량% 로 포함할 수 있다. 또한, 추가로 본 발명의 일실시예에 따른 펩타이드와 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있으나, 상기 유효성분의 함량을 초과하지 않는 것이 바람직하다.

[0042] 상기 항균 조성물에 있어서, 본 발명의 일실시예에 따른 펩타이드의 유효 투여량은 0.001 mg/kg 내지 1 g/kg의 용량으로 투여될 수 있으며, 더 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 500 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있다. 한편,

상기 투여량은 환자의 나이, 성별 및 상태에 따라 적절히 조절될 수 있다.

[0043] 상기 항균 조성물에 있어서, 본 발명의 일실시예에 따른 펩타이드는 임상 투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여 시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0044] 본 발명에서 상기 항균용 조성물이란 항미생물제를 총칭하는 의미인 항생제와 같은 의미일 수 있고, 항균제, 살균제, 방부제, 보존제 또는 제균제와 같은 의미일 수 있으며, 따라서 상기 항균용 조성물은 약학적 조성물 및 식품용 조성물로 사용될 수 있다.

[0045] 본원에서 상기 식품이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.

[0046] 본원발명에 따른 항균 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 캔디류, 쵸코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0047] 또한, 상기 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강 기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0048] 또한, 본원발명에서 상기 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명에 따른 상기 항균 활성을 갖는 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0049] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본원발명의 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0050] 본원발명의 항균 활성을 갖는 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 40중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100 ml를 기준으로 0.001 g 내지 2 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 0.1 g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명의 일실시 예에 따른 펩타이드를 포함하는 항생제는 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있고 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여 시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 상술한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제가 제공된다.

[0053] 상기 사료첨가제에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드는 민가죽해변 말미잘(*Urticina crassicornis*)로부터 유래될 수 있으며 그람 양성균, 그람 음성균 및 효모에 대하여 항균 활성을 나타낼 수 있다.

[0054] 상기 사료첨가제에 있어서, 본 발명의 일실시예에 따른 펩타이드를 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.1 내지 50 중량% 로 포함할 수 있다. 또한, 추가로 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드와 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있으나, 상기 유효성분의 함량을 초과하지 않는 것이 바람직하

다.

[0055] 본 발명의 일실시예에 따른 펩타이드는 어류가 양식되고 있는 수조의 물에 직접 살포하는 것도 가능하다.

[0057] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0059] **<실시예 1>**

[0060] **말미잘 체강액 추출물의 제조**

[0061] 실험에 사용한 민가죽해변 말미잘(*Urticina crassicornis*, 지름 8~9 cm, 높이 5~6 cm)은 2013년 1월에 부산광역시 기장군에서 구입하였다. 살아있는 상태의 말미잘로부터 체강액(coelomic fluid)을 분리한 후, 예열된 1% 아세트산 (HAc)과 1:4(v/v)의 비율로 혼합하고, 단백질 분해효소의 활성을 막기 위해 100℃에서 5분간 가열하였다. 가열된 조직은 얼음 속에서 냉각시킨 후 4℃에서 균질화하였다(T10 basic ULTRA-TURRAX, IKA, USA). 이후, 4℃, 13,000×g 조건으로 25분 동안 원심분리 하여, 상층액만을 수득하여 실험에 이용하기 직전까지 - 75℃에 보관하였다.

[0063] **<실시예 2>**

[0064] **항균활성(antibacterial activity) 측정**

[0065] 상기 실시예 1에 언급된 말미잘 체강액 추출물의 항균활성은 그람양성균인 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis* KCTC1021) 및 그람음성균인 에스케리시아 콜라이(*E. coli* D31) 균주에 대해 고감도 방사확산 분석(Ultrasensitive radial diffusion assay, URDA) 방법을 이용하여 측정하였다(Seo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 1998~2004, 2005). 구체적으로 미생물을 37℃에서 18시간 동안 TSB(Trypticase soy broth)에서 배양한 후, 상기 배양액을 McFarland 표준혼탁도 0.5가 되도록 희석하였다(Vitek Colorimeter #52-1210; Hach, Loveland, CO, USA). 상기 희석액은 약 ~108 CFU/ml에 해당하는 양으로, 희석액 0.5 ml를 9.5 ml의 깔개겔(underlay gel)[10 mM 인산 완충액(pH 6.6), 0.03% TSB 및 1% I형 한천(low EEO)]에 혼합한 후 직경 10 cm, 높이 1.5 cm 평판 접시에 도포하여 높이 1 mm의 겔을 생성하였다. 그 후, 상기 평판 접시 내에 형성된 겔에 직경 2.5 mm 크기로 구멍을 뚫어 웰(well)을 만들었다. 0.01% HAc 5㎕에 녹인 시료를 웰(well)에 주입한 후 37℃에서 3시간 동안 배양하였다. 이후 배양된 깔개 겔 위에 덮개 겔(upperlay gel)[10 mM 인산완충용액(pH 6.6), 6% TSB 및 1% 한천] 10 ml를 덮은 후, 37℃에서 16시간 동안 배양하였다. 다음 날 웰 주위에 형성된 투명지역(clear zone)의 직경을 측정함으로서 항균 활성을 확인하였다.

[0066] 그 결과, 말미잘 체강액 추출물은 바실러스와 에스케리시아 균주에 대해서 각각 5.6 mm와 7.4 mm의 직경을 갖는 투명지역을 형성하였다(도 1 참조). 이러한 결과는 말미잘 체강액이 말미잘의 선천 면역 체계에서 주요한 기능을 담당한다는 것을 의미하며, 항균 활성을 나타내는 물질이 함유되어 있음을 입증하는 것이다.

[0068] **<실시예 3>**

[0069] **항균활성 펩타이드의 분리 및 정제**

[0070] 두 단계의 역상 HPLC 방법을 사용하여 상기 실시예 1의 말미잘 체강액 추출물로부터 항균활성 펩타이드를 분리하였다.

[0071] 첫 번째 역상 HPLC 단계에서는 CapCell-Pak C18(4.6 mm×250mm) 칼럼을 사용하여 하기와 같은 조건으로 정제하였다. A 용매는 0.1 % TFA(trifluoroacetic acid)를 포함하는 100% water(pH 2.2), B 용매는 0.1 % TFA(trifluoroacetic acid)를 포함하는 100% acetonitrile(pH 2.2)을 이용하여 B 용매의 농도구배 5 → 65%(60분), 유속 1.0 ml/min, 파장 220 nm 및 온도 실온 조건으로 수행하였다. 분리한 분획들을 B. subtilis 균주에 대하여 항균활성을 측정하였으며, 그 결과 약 34% acetonitrile 농도에 용출된 분획에서 강한 항균활성이 나타났다(도 2 참조).

[0072] 도 2에서 얻어진 활성분획을 이용하여 두 번째 역상 HPLC를 수행하였다. 34% acetonitrile의 등용매(isocratic) 조건에서 CapCell-Pak C18(4.6×250 mm) 칼럼을 이용하여 최종 정제하였다. 약 10.5분의 머무름 시간(retention time, RT)을 갖는 하나의 순수한 물질을 정제하였으며, 정제된 물질은 말미잘(sea anemone) 조직 추출물로부터 정제되었으므로 'SAn1'으로 명명하였다(도 3 참조).

[0074] **<실시예 4>**

[0075] **단백질분해효소 처리**

[0076] 최종 정제한 활성물질이 가수분해 작용에 영향을 받는지의 여부를 단백질 분해 효소를 처리하여 확인하였다. 단백질 분해 효소는 250 μg/ml 크리스탈 트립신(Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, USA)을 이용하였으며, 상기 실시 예의 SAn1에 첨가하여 37℃에서 60분 동안 처리하였다. 그리고 상술한 바와 동일한 URDA 방법을 이용하여 그람 양성균인 B. subtilis에 대한 항균 활성을 측정하였다(도 4 참조).

[0077] 그 결과, 도 4의 오른쪽 패널에 나타난 바와 같이 항균활성이 현저하게 감소되었으며, 이러한 결과를 통해 SAn1이 단백질성 항균활성물질인 것을 확인하였다.

[0079] **<실시예 5>**

[0080] **산-요소-폴리아크릴아마이드겔 전기영동**

[0081] 본 발명의 일실시 예에 따른 말미잘 체강액 유래 항균활성분획의 대략적인 분자량 및 분획물의 순도를 확인하기 위해서 산-요소-폴리아크릴아마이드겔 전기영동(acid-urea-polyacrylamide gel electrophoresis, AU-PAGE)를 실행하였다. 4.8 M urea, 5% HAc, 0.48%(v/v) TEMED(tetramethylethylenediamine)와 0.22%(w/v) APS(ammonium persulphate)를 넣어 12% 아크릴 아마이드 겔(100 mm wide × 75 mm long × 1.0 mm thick)을 준비하였다. 150V로 일정하게 유지하여 5% HAc에 두어 Mini PROTEAN II Electrophoresis Cell(Bio-Rad Laboratories, US)를 이용하여 역-극성으로 60분 동안 pre-run하여 APS와 TEMED를 제거하였다. Pre-running이 끝난 후, 시료를 샘플 용액(3.0 M urea in 5% HAc containing methyl green)과 1:1 비율로 섞고 실온에서 150 V로 일정하게 50분 동안 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 겔은 쿠마시 염색용액(Coomassie brilliant blue R-250 dye)로 염색한 뒤 탈색 용액[methanol:acetic acid:water(4:1:5)]으로 염색을 다시 제거하였다.

[0082] 그 결과, 하나의 밴드가 나타났으며, 약 4 kDa대의 분자량을 지니고 있는 것으로 관찰되었다(도 5 참조).

[0084] **<실시예 6>**

[0085] **분자량 및 아미노산 서열 분석**

[0086] 본 일실시 예에 따른 정제된 항균활성펩타이드(SAn1)의 분자량 측정을 위해 선형모드((Bruker Daltonics, Billerica, MA)에 plused SMARTBEAM II(355 nm Nd:YAG 레이저; 반복속도 1 kHz)를 갖춘 Ultraflex Ⅲ MALDI time-of-flight (TOF)/TOF 질량분석기를 이용하였다. 또한, 정제된 SAn1의 N말단 아미노산 서열을 분석하기 위해 펄스 리퀴드 자동 서열분석기(Automated protein sequencer PPSQ-21A; Shimadzu, Ltd., Japan)의 자동화된 에드만 분해법(automatic Edman degradation)을 이용하여 분석하였다.

[0087] 분자량 측정 결과, 2개의 양성 이온 피크인 4194.345 Da 과 2098.877 Da이 관찰되었다. 2098.877 Da은 물질의 2가 이온화에 의해 관측된 것으로 보이며, 정제된 펩타이드의 분자량은 4194.345 Da 이다(도 6 참조). N말단 아미노산 서열 분석 결과, 총 38개 아미노산으로 구성된 일차서열이 밝혀졌으며(도 7 참조), 분석된 서열은 다음과 같다:

[0088] NH_2-GGIPCSCKDESGIYWFGRYKCSGYRETCASIFGVCCVR-OH (서열번호 1).

[0089] 에드만 분해법에 따른 상기 일차서열을 토대로 이론적 등전점 및 분자량을 계산하였다. 분석 결과, 이론적 등전점(pI)은 8.32이며, 6개의 시스테인이 이황화 결합을 하지 않았을 경우 4202.84 Da 결과 값이 나타난다. 모든 시스테인이 이황화 결합을 했다는 가정하의 이론적 분자량은 4196.84 Da으로 MALDI-TOF-MS에 의해 얻은 분자량과 근접하며, 펩타이드 내에 구성된 시스테인이 모두 이황화 결합을 하고 있다고 볼 수 있다. 본 발명의 일 실

시 예에 따른 항균활성 펩타이드 SAn1의 상동성 검사를 NCBI BLASTP를 이용하여 분석한 결과, SAn1은 종래의 펩타이드들과 48% 이하의 상동성을 가지는 신규한 펩타이드로 확인하였다.

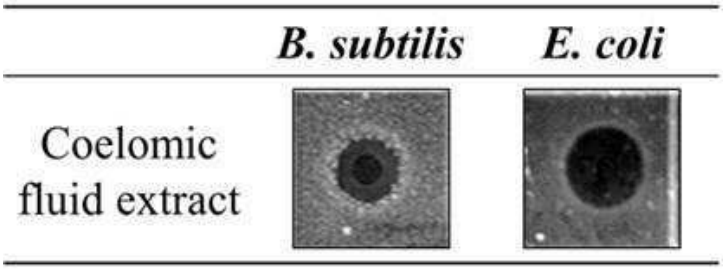
[0090] 본 발명에서 보고하는 항균활성 펩타이드 SAn1는 민가죽해변 말미잘 인두로부터 유래한 항균활성 펩타이드 SAn4(GASCDCHPFVGTYWFGISNCPSGHGYRKKCASFFGVCCVK)와 약 53%의 상동성만을 가지는 것을 확인하였다(도 8 참조). 또한, 인두 조직을 이용하여 단일 분획물을 수득하기 위해 네 단계의 정제과정을 통하여 순수 단일 분획을 수득했으나, 체강액 추출물을 사용하여 펩타이드를 수득한 결과, 두 단계의 정제과정만으로 순수한 단일 분획물을 얻을 수 있었다. 이러한 실험을 통하여 본 발명의 SAn1은 민가죽해변 말미잘의 체강액으로부터 간단한 정제과정을 통해 수득될 수 있음을 확인하였다.

[0092] 종합적으로 상기 실시예에서 상술한 바와 같이, 본 발명의 일실시 예에 따른 항균활성펩타이드 SAn1은 항균 활성이 우수하고 단일 분획물로 분리 및 정제하는 과정이 간단하여 대량으로 생산할 수 있기 때문에 각종 항생제 및 어류 등의 양식용 사료 첨가제로 사용이 가능하다.

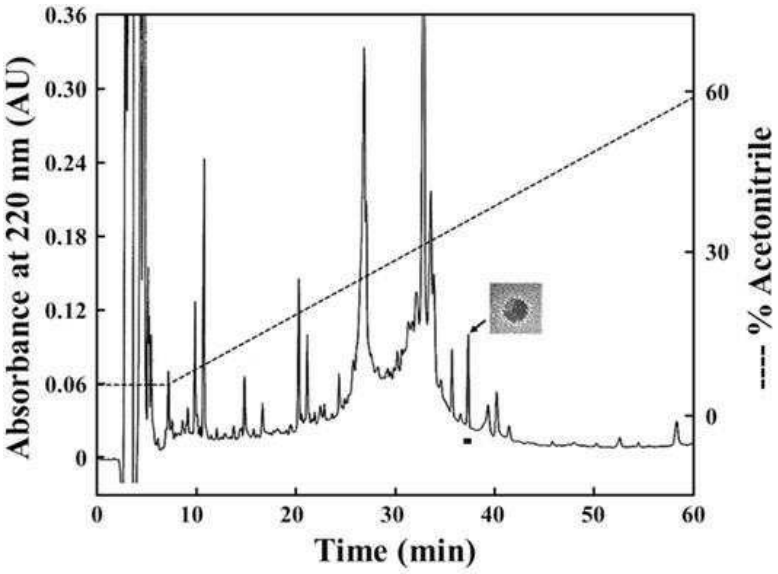
[0094] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

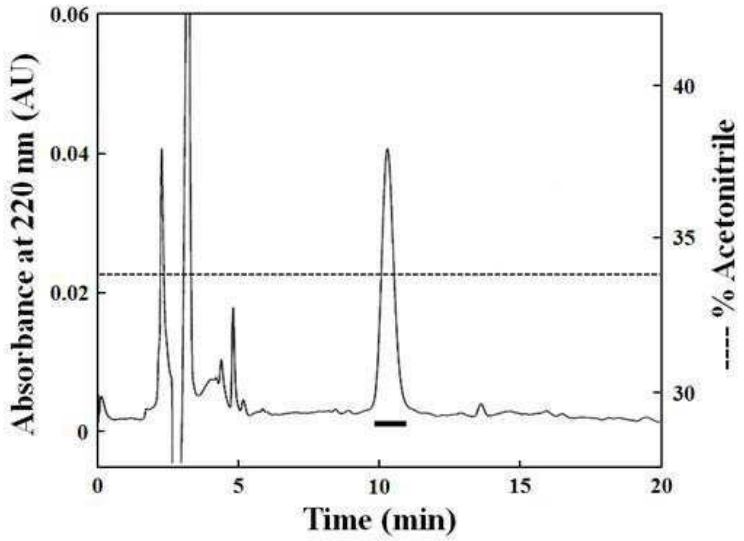
도면1



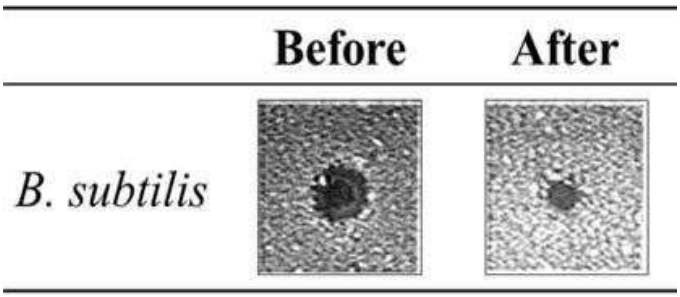
도면2



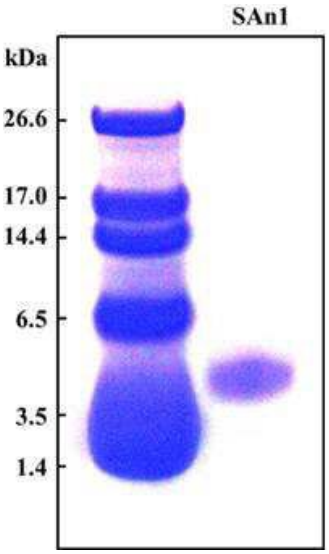
도면3


Absorbance at 220 nm (AU)
0.06
0.04
0.02
0
40
35
30
---- % Acetonitrile
0
5
10
15
20
Time (min)

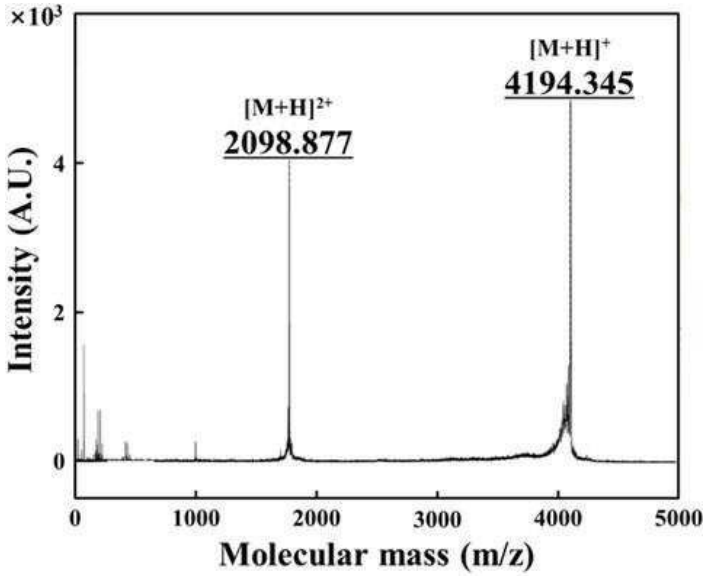
도면4


Before
After
B. subtilis

도면5

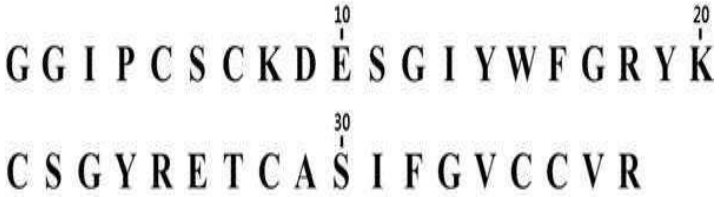

SAn1
kDa
26.6
17.0
14.4
6.5
3.5
1.4

도면6



도면7

Full amino acid sequence of SAn1:



도면8



서 열 목 록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> A novel antimicrobial peptide originated from the coelomic fluid of sea anemone Urticina crassicornis, and there of uses

<130> PN1512-359

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SAn1

<400> 1

Gly Gly Ile Pro Cys Ser Cys Lys Asp Glu Ser Gly Ile Tyr Trp Phe
1 5 10 15

Gly Arg Tyr Lys Cys Ser Gly Tyr Arg Glu Thr Cys Ala Ser Ile Phe
20 25 30

Gly Val Cys Cys Val Arg
35