



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0087868
(43) 공개일자 2015년07월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/08 (2006.01) *A61K 38/10* (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01) *C07K 1/16* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0007630

(22) 출원일자 2014년01월22일

심사청구일자 2014년02월05일

(71) 출원인

전남대학교산학협력단

광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

박윤경

전라남도 장성군 남면 마흥길 45

김영권

광주광역시 남구 회재로 1186번길 30, 현대APT 12동 503호

이항범

광주 서구 하남대로710번길 20, 501동 803호 (동천동, 우미린아파트)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03으로부터 분리된 신규한 항진균 펩타이드 B A-1 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)으로부터 유래된 신규한 항진균 펩타이드 BA-1 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)으로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 신규한 펩타이드는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*) 또는 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*) 곰팡이에 대하여 현저한 항진균 효과를 나타내고, 세포독성이 없는 것을 확인함으로써, 항진균용 약학적 조성물, 화장품 조성물, 농약, 건강식품, 방부용 조성물 및 의약품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 111095-03-1-HD110

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 농림수산식품연구개발사업

연구과제명 식물내생 미생물로부터 천연항생 펩타이드 분리 및 기작연구

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.10 ~ 2014.11.09

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)으로 부터 유래된 것을 특징으로 하는 항진균 펩타이드.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 분자량이 1505.1 Da인 것을 특징으로 하는 항진균 펩타이드.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 푸사리움 속(*Fusarium sp.*) 곰팡이에 대하여 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항진균 펩타이드.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 푸사리움 속(*Fusarium sp.*) 곰팡이는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*) 또는 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)인 것을 특징으로 하는 항진균 펩타이드.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 푸사리움 속 곰팡이는 포자 또는 균사 상태인 것을 특징으로 하는 항진균 펩타이드.

청구항 7

i) 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)을 배양한 배양액을 원심분리하여 상층액 분획을 수득하는 단계;

ii) 단계 i)의 상층액 분획을 추출한 후 전처리(sample preparation)하는 단계; 및

iii) 단계 ii)의 추출물을 C₁₈ 컬럼을 충전한 크로마토그래피에서 이동상인 아세트니트릴 B의 농도기울기 30 내지 60%에서 용출하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드의 제조 방법.

청구항 8

제 1항의 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 약학적 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 푸사리움 속(*Fusarium sp.*) 곰팡이에 대하여 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항진균용 약학적 조성물.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 푸사리움 속(*Fusarium sp.*) 곰팡이는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*) 또는 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)인 것을 특징으로 하는 항진균용 약학적 조성물.

청구항 11

제 8항에 있어서, 상기 푸사리움 속 곰팡이는 포자 또는 균사 상태인 것을 특징으로 하는 항진균용 약학적 조성물.

청구항 12

제 1항의 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 방부용 조성물.

청구항 13

제 1항의 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 화장료 조성물.

청구항 14

제 1항의 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 외용제.

청구항 15

제 1항의 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 건강식품.

청구항 16

제 1항의 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 농약.

청구항 17

제 1항의 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 의약품.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03으로부터 분리된 신규한 항진균 펩타이드 BA-1 및 그의 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 식물이나 동물들은 항생제 기능의 펩타이드를 자연적으로 생산하는 것으로 알려져 있다(Bevins et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 1990, 59, 395-414). 이러한 펩타이드의 항생작용은 숙주 방어 및 선천적 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다(Boman, H. G., *Cell*, 65, 205, 1991; Boman, H. G., *Annu. Rev. Microbiol.*, 13, 61, 1995]. 항생기능의 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β-시트(sheet) 펩타이드, α-회전형(helical) 양친화성 분자 및 프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드로 분류되고 있다(Mayasaki et al., *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1998, 9, 269-280). 이중에서 가장 많이 존재하는 구조는 시스테인(cysteine) 잔기가 없고 양친화성 알파 나선형을 형성하는 분자이며, 곤충에서 발견된 세크로핀(cecropin)이 대표적인 항생 펩타이드 구조이다.
- [0003] 또한, 생체 내에서 생산되는 상기 펩타이드 이외에 박테리오킨(bacteriocin)이란 단백질 역시 주변의 동종 또는 이종의 세균들과 경쟁하기 위해 분비되어 유해 세균을 죽이는 항생물질로서의 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 이러한 박테리오킨은 구조에 따라, 란티바이오틱스(lantibiotics), 비란티바이오틱스(nonlantibiotics) 및 신호 펩타이드(signal peptide)의 세 부류로 분류된다(Cintas et al., *J. Bad.*, 1998, 180, 1988-1994). 생체 내에서 생성되면서 항생 기능을 수행하는 펩타이드 또는 박테리오킨은 기존의 항생제가 화학물질로 이루어져 유발되는 항생물질로 인한 항생제 내성, 항생제 쇼크 등의 문제점을 해소할 수 있다.
- [0004] 따라서, 기존의 항생제를 천연 항생제 개발로 대체하려는 노력이 꾸준히 진행되어 오고 있다. 천연 항생제는 천연소재 또는 미생물로부터 선택되어 생화학적 또는 생리학적 차이를 극대화하여, 바이러스, 세균, 효모, 곰팡이 등을 선택적으로 제어하고, 인체에 무해하거나 독성을 최소한으로 낮춘 항생제를 말한다. 현재 보고되어 있는 천연 항생제로는 편백나무에서 회노키티올, 목련에서 메그노놀, 자몽종자 추출물인 DF-100등이 있으나, 현재 사용되는 규모는 매우 미미하다. 현재, 천연 허브추출물이 세포 증식 기작을 억제하여 미생물에 대한 살균 효과가 크고, 식물성 천연 살균 소독제로서 독성이 없고, 부식성이 없어 인체에 무해하며 안전한 천연 항생제로 보고된 바 있으나, 재배 규모가 작고, 다수가 외래종으로서 국내에서 재배하기에 까다로운 문제점 등으로 인하여 천연 항생제로서 활용 하 데에 있어서는 한계가 있다.
- [0005] 바실러스 식물 또는 동물들은 항생제 기능의 펩타이드를 자연적으로 생산하는 것으로 알려져 있다(Bevins et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 1990, 59, 395-414). 이러한 펩타이드의 항생작용은 숙주 방어 및 선천적 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다(Boman, H. G., *Cell*, 65, 205, 1991; Boman, H. G., *Annu. Rev. Microbiol.*, 13, 61, 1995). 항생기능의 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β-시트(sheet) 펩타이드, α-회전형(helical) 양친화성 분자, 및 프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드로 분류되고 있다(Mayasaki et al., *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1998, 9, 269-280). 특히, 이중에서 가장 많이 존재하는 구조는 시스테인(cysteine) 잔기가 없고 양친화성 알파 나선형을 형성하는 분자이며, 곤충에서 발견된 세크로핀(cecropin)이 대표적인 항생 펩타이드 구조이다.
- [0006] 또한, 생체 내에서 생산되는 상기 펩타이드 이외에 박테리오킨(bacteriocin)이란 단백질 역시 주변의 동종 또는 이종의 세균들과 경쟁하기 위해 분비되어 유해 세균을 죽이는 항생물질로서의 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 이러한 박테리오킨은 구조에 따라, 란티바이오틱스(lantibiotics), 비란티바이오틱스(nonlantibiotics) 및 신호 펩타이드(signal peptide)의 세 부류로 분류된다(Cintas et al., *J. Bad.*, 1998, 180, 1988-1994). 생체 내에서 생성되면서 항생 기능을 수행하는 펩타이드 또는 박테리오킨은 기존의 항생제가 화학물질로 이루어져 유발되는 항생물질로 인한 항생제 내성, 항생제 쇼크 등의 문제점을 해소할 수 있다.
- [0007] 이에, 본 발명자들은 생물 소재인 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03 (*Bacillus amyloliquefaciens*)로부터 천연 항균제를 개발하기 위해 노력한 결과, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)으로부터 추출, 가열, 분리 및 정제하여 신규한 BA-1 펩타이드를 획득하였고, 상기 BA-1 펩타이드가 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)에 대하여 현저한 항진균 효과를 나타내고, 사람의 적혈구 세포에서 용혈 활성 측정을 통해 세포독성이 없는 것을 확인함으로써, 상기 펩타이드를 천연 항진균제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03으로부터 분리된 신규한 항진균 펩타이드 BA-1 및 이의 제조 방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 항진균용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0010] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 제공한다.

[0011] 본 발명은

[0012] i) 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)을 배양한 배양액을 원심분리하여 상층액 분획을 수득하는 단계;

[0013] ii) 단계 i)의 상층액 분획을 추출한 후 전처리(sample preparation)하는 단계; 및

[0014] iii) 단계 ii)의 추출물을 C₁₈ 컬럼을 충전한 크로마토그래피에서 이동상인 아세트오니트릴 B의 농도기울기 30 내지 60%에서 용출하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드의 제조 방법을 제공한다.

[0015] 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 방부용 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 화장료 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 외용제를 제공한다.

[0019] 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 건강식품을 제공한다.

[0020] 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 농약을 제공한다.

[0021] 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 의약품의품을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)으로부터 분리한 신규한 BA-1 펩타이드는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)에 대하여 현저한 항진균 효과를 나타내고, 세포독성이 없는 것을 확인함으로써, 항진균용 약학적 조성물, 화장료 조성물, 농약, 건강 식품, 방부용 조성물 및 의약품 보존제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)을 배양 한 후, 고상추출(Solid

Phase Extraction, SPE)로 전처리한 시료를 정제하여 분리된 펩타이드를 나타낸 도이다.

도 2는 BA-1 펩타이드의 분자량을 확인한 도이다.

도 3은 BA-1 펩타이드의 N- 말단 아미노산 서열을 나타낸 도이다.

도 4는 BA-1 펩타이드의 항진균 효과를 확인한 도이다:

A: 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*) 및 BA-1 펩타이드 처리군; 및

B: 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*) 및 BA-1 펩타이드 처리군.

도 5는 BA-1 펩타이드의 항진균 효과를 확인한 도이다:

A: 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*) 포자 및 BA-1 펩타이드 처리군; 및

B: 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*) 포자 및 BA-1 펩타이드 처리군.

도 6은 BA-1 펩타이드의 항진균 효과를 확인한 도이다:

A: 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*) 균사 및 BA-1 펩타이드 처리군; 및

B: 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*) 균사 및 BA-1 펩타이드 처리군.

도 7은 BA-1 펩타이드의 사람의 적혈구 세포에 대한 세포 파괴 정도(Hemolytic)를 측정하는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 제공한다.

상기 펩타이드는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)으로부터 유래된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 펩타이드는 분자량이 1505.1 Da인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 펩타이드는 푸사리움 속(*Fusarium sp.*) 곰팡이에 대하여 항진균 활성을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 푸사리움 속(*Fusarium sp.*) 곰팡이는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*) 또는 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 푸사리움 속 곰팡이는 포자 또는 균사 상태인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 항진균 펩타이드는 60℃ 내지 80℃에서 열 안정성을 가지는 것이 바람직하고 70℃에서 열 안정성을 가지는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 항진균 펩타이드를 추출하기 위하여, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03을 용매로 추출하여 단백질 추출물을 수득하였다.

또한, 상기 단계로부터 얻은 추출물은 C₁₈ 칼럼(5 μ m, 300 Å, 4.6 x 250 mm, Vydac, Hesperia, CA) 역상 HPLC(Reverse Phase HPLC)(Shimadzu, Japan)를 이용하여 분리된 펩타이드(도 1 참조)를 수득하여 "BA-1"으로 명명하였다.

또한, 본 발명의 BA-1 펩타이드를 자동화 에드만 분해법(Automated Edman degradation)을 사용하여 N-말단 아미노산 서열을 확인하기 위하여 확인한 결과, BA-1 펩타이드의 아미노산 서열은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 신규 펩타이드인 것을 확인하였다(도 3 참조).

또한, 질량분석기 MALDI-TOF/MS를 이용하여 본 발명의 BA-1 펩타이드 분자량을 측정하는 결과, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)으로부터 유래된 BA-1 펩타이드 분자량은 1505.1 Da 인 것을 확인하였다(도 2 참조).

또한, 본 발명의 BA-1 펩타이드의 항진균 활성을 측정하기 위하여, 한국생명공학연구원 산하(Korea Collection

for Type Cultures, KCTC)에서 제공받은 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*, KCTC 6326) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*, KCTC 16909)에 상기 펩타이드를 처리하여 항진균 활성을 측정한 결과, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)으로부터 유래된 BA-1 펩타이드는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*) 또는 솔라니 및 푸사리움 옥시스포룸 포자에 대하여 현저한 항진균 활성을 가지는 것을 확인하였고(도 4 참조 및 도 5 참조), 상기 펩타이드는 솔라니 및 푸사리움 옥시스포룸 균사(hyphal)가 나타난 상태에 대하여 항진균 활성을 가지는 것을 확인하였다(도 6 참조).

[0037]

또한, 본 발명의 BA-1 펩타이드에 대하여, 사람의 적혈구 용혈 활성의 측정을 통하여 세포에 대한 세포 파괴정도(Hemolytic)를 측정한 결과, 대조군인 펠리틴의 경우, 펩타이드의 농도 7 ug의 조건에서는 적혈구 세포들이 100% 파괴되는 것을 확인하였다. 반면에, 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*) 유래 BA-1 펩타이드를 동일 농도 조건에서 실시한 결과, 가장 높은 농도인 450 ug에서도 적혈구 세포들이 전혀 파괴되지 않은 결과를 보임으로써, 세포독성이 전혀 없음을 확인하였다(도 7 참조).

[0038]

따라서, 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)로부터 유래된 신규한 펩타이드는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*, KCTC 6326) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*, KCTC 16909)에 대하여 현저한 항진균 효과를 나타내고, 세포독성이 없는 것을 확인함으로써, 항진균용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0039]

또한, 본 발명은

[0040]

i) 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)을 배양한 배양액을 원심분리하여 상층액 분획을 수득하는 단계;

[0041]

ii) 단계 i)의 상층액 분획을 추출한 후 전처리(sample preparation)하는 단계; 및

[0042]

iii) 단계 ii)의 추출물을 C₁₈ 컬럼을 충전한 크로마토그래피에서 이동상인 아세트오니트릴 B의 농도기울기 30 내지 60%에서 용출하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드의 제조 방법을 제공한다.

[0043]

상기 분리를 위한 방법으로 고상 추출, 한외여과(ultrafiltration), 크로마토그래피(chromatography)와 같은 당 업계의 통상적인 분리 방법을 사용하는 것이 바람직하며, 구체적으로는 음이온교환 크로마토그래피(anion exchange chromatography), 크기배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 역상 크로마토그래피(reverse-phase chromatography) 또는 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography; HPLC) 방법을 포함하는 크로마토그래피 방법을 사용하는 것이 더욱 바람직하고, 보다 구체적으로 C₁₈ 역상 HPLC 방법을 사용하는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0044]

또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 약학적 조성물을 제공한다.

[0045]

상기 푸사리움 속(*Fusarium sp.*) 곰팡이에 대하여 항진균 활성을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0046]

상기 푸사리움 속(*Fusarium sp.*) 곰팡이는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*) 또는 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0047]

상기 푸사리움 속 곰팡이는 포자 또는 균사 상태인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0048]

본 발명의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)로부터 유래된 신규한 펩타이드는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*, KCTC 6326) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*, KCTC 16909)에 대하여 현저한 항진균 효과를 나타내고, 세포독성이 없는 것을 확인함으로써, 항진균용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0049]

본 발명의 펩타이드는 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여는 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강(nasal), 흡입, 안구 및 피하와 같은 경구 이외의 투

여경로를 통한 투여를 의미할 수 있다.

- [0050] 즉, 본 발명의 항진균 펩타이드는 실제의 비경구의 여러가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명의 항진균 펩타이드는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브 산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 황산화제(antioxidants), 킬레이트화제(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 항진균 펩타이드의 유효용량은 0.01 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.1 내지는 10 mg/kg 이며, 하루 1 회 내지 3 회 투여될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 약학적 조성물에서 본 발명의 신규한 항진균 펩타이드의 총 유효량은 볼루스(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 주입(infusion) 등에 의해 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 나이 및 건강상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이므로 이러한 점을 고려할 때, 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 신규한 항진균 펩타이드의 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.
- [0054] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 외용제를 제공한다.
- [0055] 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)로부터 유래된 신규한 펩타이드는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*, KCTC 6326) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*, KCTC 16909)에 대하여 현저한 항진균 효과를 나타내고, 세포독성이 없는 것을 확인함으로써, 항진균용 외용제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0057] 상기 항진균용 화장료 조성물은 구체적으로 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*)와 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)에 대하여 항진균 활성을 가지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0058] 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)로부터 유래된 신규한 펩타이드는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*, KCTC 6326) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*, KCTC 16909)에 대하여 현저한 항진균 효과를 나타내고, 세포독성이 없는 것을 확인함으로써, 항진균용 화장료 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 항진균 펩타이드 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들이 포함되며, 예컨대 황산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [0060] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 통상적으로 함유되는 화장료 조성물에 본 발명의 펩타이드는 0.1 내지 50 중량%, 바람직하게는 1 내지 10 중량%의 양으로 첨가될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데

이션, 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 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0062] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 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.

[0063] 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.

[0064] 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.

[0065] 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.

[0066] 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 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도메타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 건강식품을 제공한다.

[0068] 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)로부터 유래된 신규한 펩타이드는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*, KCTC 6326) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*, KCTC 16909)에 대하여 현저한 항진균 효과를 나타내고, 세포독성이 없는 것을 확인함으로써, 항진균용 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0069] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 과자류, 빵류, 면류 등과 같은 각종 식품류, 물, 청량음료, 과일음료 등의 드링크류, 컵, 차, 비타민 복합제, 조미료류, 건강기능 식품류 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0070] 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 5 중량%로 가할 수 있으며 건강음료 조성물에는 100 을 기준으로 0.01 내지 5.0 g, 바람직하게는 0.01 내지 1.0 g의 비율로 첨가할 수 있다. 그러나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0071] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 펩타이드를 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어, 말토스, 수크로즈 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어, 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마킨, 스테비아 추출물 등), 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탄 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 0.1 내지 2.0 g, 바람직하게는 약 0.1 내지 1.0 g이

다.

[0072] 본 발명의 건강기능식품은 기재로 되는 식품의 제조과정 중에 상술한 본 발명의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 첨가하는 공정을 가함으로써 또는 기재로 되는 식품의 제조 후에 상술한 본 발명의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 첨가하는 공정을 가함으로써 용이하게 얻을 수 있다. 이때 필요에 따라 맛과 냄새 교정제를 첨가하여도 좋다.

[0073] 상기 외에 본 발명의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 100 중량부 당 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0074] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 방부용 조성물을 제공한다.

[0075] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 농약을 제공한다.

[0076] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 의약품의 유효성분으로 제공한다.

[0077] 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)로부터 유래된 신규한 펩타이드는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*, KCTC 6326) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*, KCTC 16909)에 대하여 현저한 항진균 효과를 나타내고, 세포독성이 없는 것을 확인함으로써, 항진균용 방부용 조성물, 농약 및 의약품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0078] 상기 방부 조성물에는 화장품 보존제 또는 의약품 보존제 등이 있다. 상기 식품의 방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제는 의약품의 변질, 부패, 변색 및 화학변화를 방지하기 위해 사용되는 첨가물로서 살균제, 산화방지제가 이에 포함되며 세균, 곰팡이, 효모 등 미생물의 증식을 억제하여 식품 및 의약품에서 부패미생물의 발육저지 또는 살균작용을 하는 등의 기능성 항생제도 포함된다. 이러한 방부 조성물의 이상적인 조건으로는 독성이 없어야 하며, 미량으로도 효과가 있어야 한다.

[0079] 본 발명의 조성물을 의약품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물 또는 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0080] 본 발명의 의약품 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워품, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충전제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충전제일 수 있다.

[0081] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0082] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0083] <실시예 1> 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)으로부터 단백질 추출

[0084] 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)을 32℃ 배양액(LB media, DIFCO)에서 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양액을 14,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 추출물 상층액 분획물을 회수하였다. 상기 상층액 분획물은 고상 추출(Solid Phase Extraction) 방법을 사용하여 전처리(sample

preparation)한 후 펩타이드를 수득하였다.

[0085] <실시예 2> 펩타이드의 정제

[0086] 상기 <실시예 1>로부터 수득한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)으로부터 유래된 펩타이드를 C₁₈ 칼럼(5 μ m, 300 Å, 4.6 x 250 mm, Vydac, Hesperia, CA) 역상 HPLC(Reverse Phase HPLC)(Shimadzu, Japan)를 이용하여 정제하였다. 이때, 완충용액(0.1% TFA가 포함된 아세트니트릴 B)의 기울기(linear gradient, 30-60%, 1 ml/분, 30 분)에 의해 용출 한 후(도 1), 피크의 분획을 모아 항진균 활성을 측정하였으며, 이를 "BA-1"으로 명명하였다.

[0087] <실시예 3> 분자량 및 아미노산 서열 확인

[0088] 상기 <실시예 2>로 부터 수득한 BA-1 펩타이드를 자동화 에드만 분해법을 사용하여 N-말단 아미노산 서열을 확인하기 위하여 하기와 같은 방법을 수행하였다. 또한, 질량분석기 MALDI-TOF/MS를 이용하여 분자량을 측정하였다.

[0089] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)으로부터 유래된 BA-1 펩타이드 분자량은 1505.1 Da이며(도 2), 상기 BA-1 펩타이드의 아미노산 서열은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 신규 펩타이드인 것을 확인하였다(도 3).

[0090] <실시예 4> BA-1 펩타이드의 항진균 활성 측정

[0091] 상기 <실시예 2>로부터 수득한 BA-1 펩타이드의 항진균 활성을 측정하기 위하여 하기와 같은 방법을 수행하였다.

[0092] 구체적으로, 한국생명공학연구원 산하(Korea Collection for Type Cultures, KCTC)에서 제공받은 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*, KCTC 6326) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*, KCTC 16909)을 인산나트륨 배지로 희석하여 50 μ l 균체 및 50 μ l 본 발명의 펩타이드(25 μ g)를 혼합하여 1 ml당 5×10^5 의 균체 농도로 페트리 디쉬(petri dish)에 분주하였고, 음성 대조군에는 본 발명의 펩타이드 대신 배지만을 분주하여 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 이후, 항진균 활성을 눈으로 직접 확인하기 위하여 한천배지에 이를 농도별(1: 1 μ g, 2: 0.5 μ g, 3: 0.25 μ g, 4: 0.125 μ g, 5: 0.0625 μ g)로 희석하여 도말 한 후 37°C 배양기에서 18시간 동안 배양하였다. 또한 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)의 포자 상태와 상기 포자 상태를 28°C에서 12시간 배양시킨 후 균사(hyphal)가 나타난 상태에서 상기 <실시예 2>로부터 수득한 본발명의 펩타이드들을 처리하고 광학현미경으로 관찰하였다.

[0093] 그 결과, 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)으로부터 유래된 BA-1 펩타이드는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*) 또는 솔라니 및 푸사리움 옥시스포룸 포자에 대하여 현저한 항진균 활성을 가지는 것을 확인하였고(도 4 및 도 5), 상기 펩타이드는 솔라니 및 푸사리움 옥시스포룸 균사(hyphal)가 나타난 상태에 대하여 항진균 활성을 가지는 것을 확인하였다(도 6).

[0094] <실시예 5> 적혈구 용혈 활성의 측정

[0095] 상기 <실시예 2>로부터 수득한 BA-1 펩타이드에 대하여, 사람의 적혈구 용혈 활성의 측정을 통하여 세포독성 여부를 판별하기 위하여 하기와 같이 실시하였다.

[0096] 구체적으로, 사람의 적혈구(human erythrocytes)를 PBS(phosphate-buffered saline: 35 mM 포스페이트 완충용액/0.15 M NaCl의 혼합용액, pH 7.0) 완충용액으로 3회 세척하고, PBS 완충용액으로 희석한 8.0% 적혈구 용액을 96-웰 마이크로적정 플레이트(microtiter plate)에 100 μ l씩 로딩한 후, <상기 실시예 2>로부터 수득한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*) 추출물로부터 유래한 BA-1 펩타이드를 100 μ l씩 혼합 한 후, 37°C에서 1시간 동안 배양하고 414 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 적혈구 용혈 활성을 비교하기 위하여, 대조군으로서 공지된 멜리틴(melittin)에 동일하게 실시하였다. 이때, 0.1% 트리톤 X-100로 처리하였을 경우의 값을 100% 용혈도로 계산하고, 펩타이드의 용혈율, 즉 세포 파괴정도(hemolysis)는 하기

[수학식 1]에 의하여 산출하였다.

수학식 1

$$\% \text{ 적혈구 파괴능 (hemolysis)} = \left(\frac{\text{흡광도 A} - \text{흡광도 B}}{\text{흡광도 C} - \text{흡광도 B}} \right) \times 100$$

[0097]

[0098]

상기 식에서, 흡광도 A는 414 nm 파장에서 펩타이드 용액 처리시의 흡광도;

[0099]

흡광도 B는 414 nm 파장에서 PBS 처리시의 흡광도 ; 및

[0100]

흡광도 C는 414 nm 파장에서 0.1% 트리톤 X-100 처리시의 흡광도.

[0101]

그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*)으로부터 분리된 BA-1 펩타이드를 사람의 적혈구 세포에 대한 세포 파괴정도(Hemolytic)를 측정한 결과, 대조군인 멜리틴의 경우, 펩타이드의 농도 7 ug의 조건에서는 적혈구 세포들이 100% 파괴되는 것을 확인하였다. 반면에, 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 EML-CAP-03(*Bacillus amyloliquefaciens*) 유래 BA-1 펩타이드를 동일 농도 조건에서 실시한 결과, 가장 높은 농도인 450 ug에서도 적혈구 세포들이 전혀 파괴되지 않은 결과를 보임으로써, 세포독성이 전혀 없음을 확인하였다(도 7).

[0102]

하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

[0103]

<제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0104]

<1-1> 산제의 제조

[0105]

본 발명의 펩타이드 20 mg

[0106]

유당 20 mg

[0107]

상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0108]

<1-2> 정제의 제조

[0109]

본 발명의 펩타이드 10 mg

[0110]

옥수수전분 100 mg

[0111]

유 당 100 mg

[0112]

스테아린산 마그네슘 2 mg

[0113]

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0114]

<1-3> 캡슐제의 제조

[0115]

본 발명의 펩타이드 10 mg

[0116]

결정성 셀룰로오스 3 mg

[0117] 락토오스 14.8 mg

[0118] 스테아린산 마그네슘 0.2 mg

[0119] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0120]

[0121] <1-4> 액제의 제조

[0122] 본 발명의 펩타이드 20 mg

[0123] 이성화당 10 g

[0124] 만니톨 5 g

[0125] 정제수 적량

[0126] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0127] <1-5> 주사제의 제조

[0128] 본 발명의 펩타이드 10 $\mu\text{g/ml}$

[0129] 묽은 염산 BP pH 7.6로 될 때까지

[0130] 주이용 염화나트륨 BP 최대 1 ml

[0131] 적당한 용적의 주이용 염화나트륨 BP 중에 본 발명의 펩타이드를 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 이용하여 pH 7.6로 조절하고, 주이용 염화나트륨 BP를 이용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120℃에서 15 분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

[0132] <제조예 2> 화장품의 제조

[0133] <2-1> 유연화장수(스킨)

[0134] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 유연화장수를 제조하기 위해 하기 [표1]에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 1

[0135]

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1 ~ 30 %
1,3-부틸렌글리콜	3.0
글리세린	5.0
폴리옥시에틸렌(60) 경화피마자유	0.2
에탄올	8.0
구연산	0.02
구연산나트륨	0.06
방부제	미량
향료	미량
정제수	To 100

[0136] <2-2> 영양화장수(로션)

[0137] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 영양화장수를 제조하기 위해 하기 [표 2]에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 2

[0138]

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1 ~ 30 %
1,3-부틸렌글리콜	8.0
글리세린	5.0
스쿠알란	10.0
모노올레인산폴리옥시에틸렌소르비탄	2.0
유창목오일	0.1 ~ 30 %
1,3-부틸렌글리콜	3.0
글리세린	5.0
폴리옥시에틸렌(60) 경화피마자유	0.2
에탄올	8.0
구연산	0.02
구연산나트륨	0.06
방부제	미량
향료	미량
정제수	To 100

[0139]

<2-3> 에센스

[0140]

본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 에센스를 제조하기 위해 하기 [표 3]에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 3

[0141]

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1 ~ 30 %
시토스테롤	1.7
플리글리세릴2-올레이트	1.5
세라마이드	0.7
세테아레스-4	1.2
콜레스테롤	1.5
디세틸포스페이트	0.4
농글리세린	5.0
카르복시비닐폴리머	0.2
산탄검	0.2
방부제	미량
향료	미량
정제수	To 100

[0142]

<2-4> 세안제(클렌징폼)

[0143]

본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 세안제(클렌징폼)를 제조하기 위해 하기 [표 4]에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조할 수 있다.

표 4

[0144]

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1 ~ 30 %
N-아실글루타민산나트륨	20.0
글리세린	10.0
PEG-400	15.0
프로필렌글리콜	10.0
POE(15) 올레일알코올에테르	3.0
라우린유도체	2.0
메틸파라벤	0.2
EDTA-4Na	0.03

항료	0.2
정제수	To 100

[0145]

<2-5> 영양크림

[0146]

본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 영양크림을 제조하기 위해 하기 [표 5]에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조한다.

표 5

[0147]

배합성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1 ~ 30 %
바셀린	7.0
유동파라핀	10.0
밀납	2.0
폴리솔베이트60	2.5
솔비탄세스퀴올레이트	1.5
스쿠알란	3.0
프로필렌글리콜	6.0
글리세린	4.0
트리에탄올아민	0.5
산탄검	0.5
토코페닐아세테이트	0.1
향, 방부제	미량
정제수	To 100

[0148]

<2-6> 마사지크림

[0149]

본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 마사지크림을 제조하기 위해 하기 [표 6]에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조한다.

표 6

[0150]

배합성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1 ~ 30 %
프로필렌글리콜	6.0
글리세린	4.0
트리에탄올아민	0.5
밀납	2.0
토코페닐아세테이트	0.1
폴리솔베이트60	3.0
솔비탄세스퀴올레이트	2.5
세테아릴알코올	2.0
유동파라핀	30.0
산탄검	0.5
향, 방부제	미량
정제수	To 100

[0151]

<2-7> 팩

[0152]

본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 팩을 제조하기 위해 하기 [표 7]에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조한다.

표 7

[0153]

배합성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1 ~ 30 %
프로필렌글리콜	2.0

글리세린	4.0
폴리비닐알코올	10.0
에탄올	7.0
파이지-40 히드로게비이트드캐스터오일	0.8
트리에탄올아민	0.3
향, 방부제	미량
정제수	To 100

[0154]

<제조예 3> 식품의 제조

[0155]

본 발명의 펩타이드를 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

[0156]

<3-1> 밀가루 식품의 제조

[0157]

본 발명의 펩타이드 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 항진균용 건강식품을 제조하였다.

[0158]

<3-2> 유제품(dairy products)의 제조

[0159]

본 발명의 펩타이드 5 ~ 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0160]

<3-3> 전식의 제조

[0161]

현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0162]

검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0163]

본 발명의 펩타이드를 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0164]

상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 본 발명의 펩타이드의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0165]

곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0166]

종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0167]

본 발명의 펩타이드(3 중량부),

[0168]

영지(0.5 중량부), 및

[0169]

지황(0.5 중량부).

[0170]

<3-4> 건강보조식품의 제조

[0171]

본 발명의 펩타이드 100 mg

[0172]

비타민 혼합물 적량

[0173]

비타민 A 아세테이트 70 μ g

[0174]

비타민 E 1.0 mg

[0175]

비타민 B1 0.13 mg

[0176]

비타민 B2 0.15 mg

[0177]

비타민 B6 0.5 mg

[0178]	비타민 B12	0.2 μ g
[0179]	비타민 C	10 mg
[0180]	비오틴	10 μ g
[0181]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0182]	엽산	50 μ g
[0183]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0184]	무기질 혼합물	적량
[0185]	황산제1철	1.75 mg
[0186]	산화아연	0.82 mg
[0187]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0188]	제1인산칼륨	15 mg
[0189]	제2인산칼슘	55 mg
[0190]	구연산칼륨	90 mg
[0191]	탄산칼슘	100 mg
[0192]	염화마그네슘	24.8 mg
[0193]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	

[0194] **<제조예 4> 건강음료의 제조**

[0195]	본 발명의 펩타이드	100 mg
[0196]	구연산	100 mg
[0197]	올리고당	100 mg
[0198]	매실농축액	2 mg
[0199]	타우린	100 mg
[0200]	정제수를 가하여 전체	500 ml

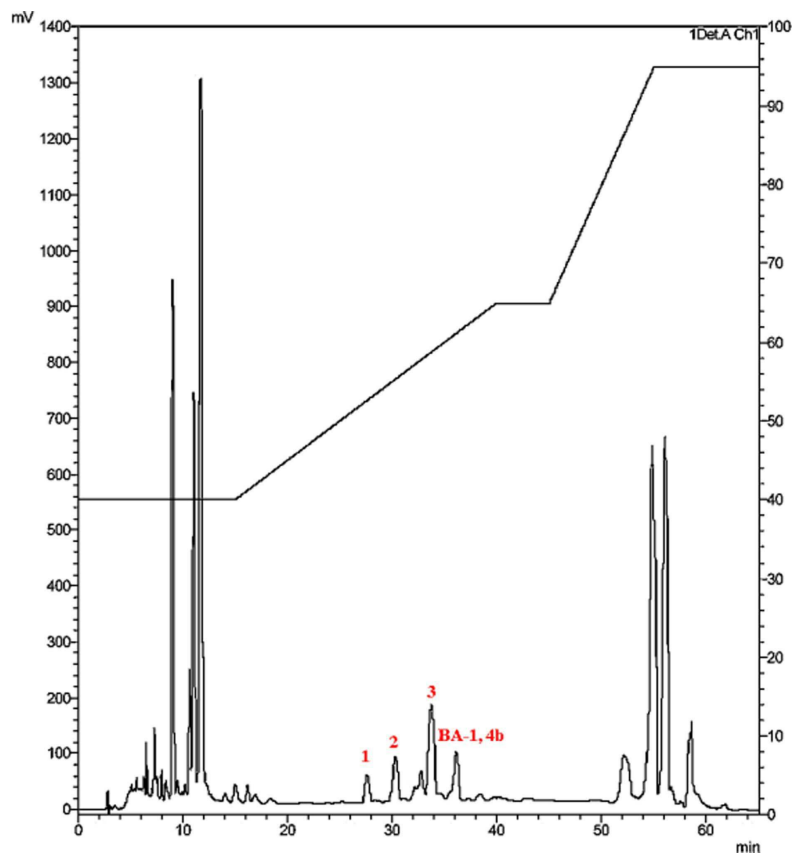
[0201] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 1 L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0202] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

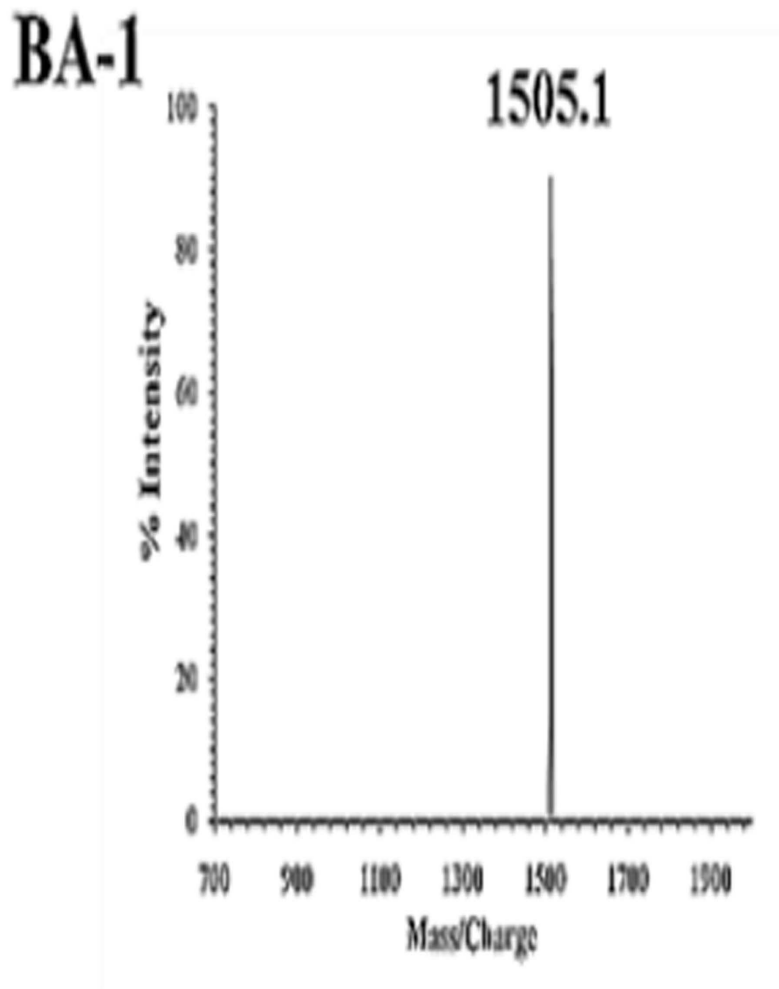
[0203] 이상의 본 발명은 상기에 기술된 실시예 및 제조예들에 의해 한정되지 않고, 통상의 기술자들에 의해 다양한 변형 및 변경을 가져올 수 있으며, 그외의 색채 화장품을 포함하는 다양한 용도의 화장품에 적용될 수 있는 것이고, 그 효능에 따라 인체에 얇게 도포하여 바를 수 있는 약제 즉, 연고로 제조에 이용될 수 있고, 이는 첨부된 청구항에서 정의되는 본 발명의 취지와 범위에 포함된다.

도면

도면1



도면2



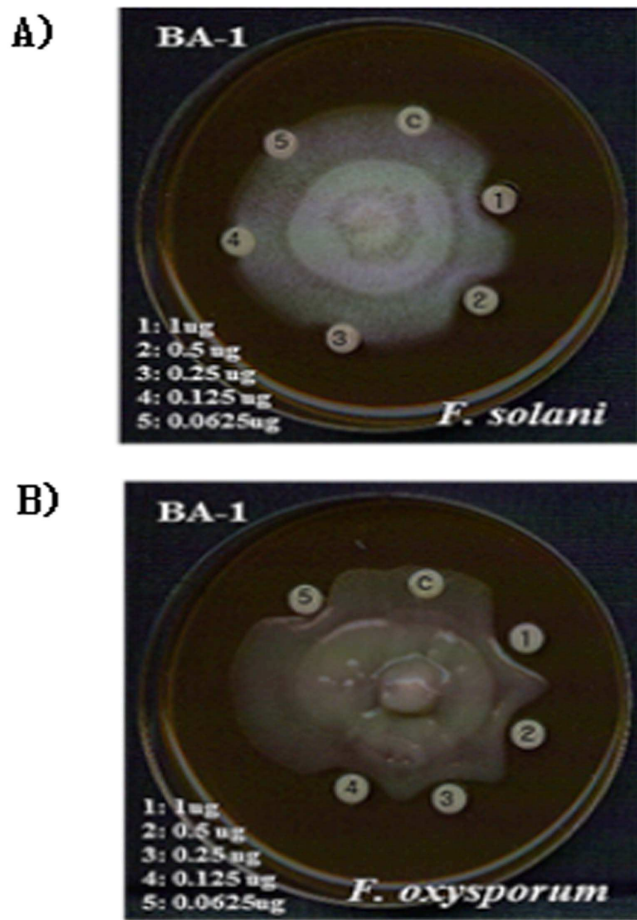
도면3

BA-1

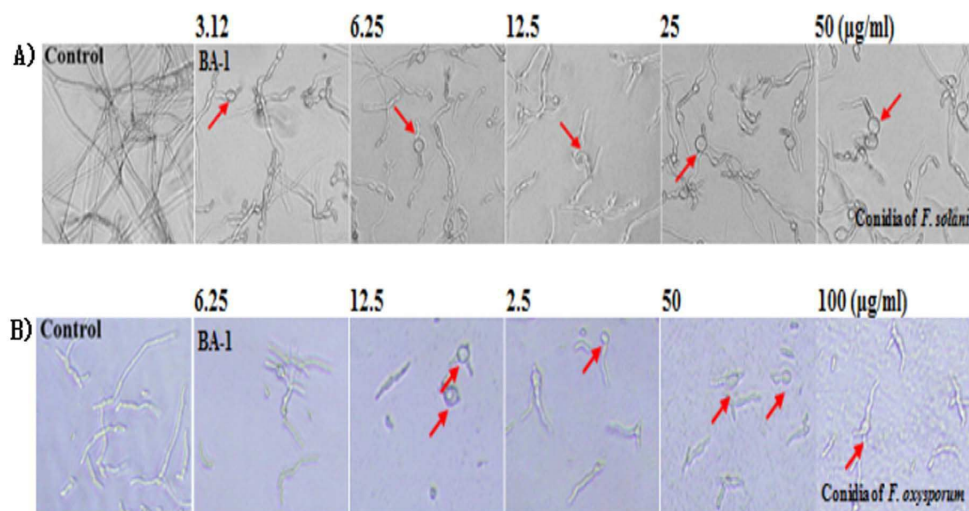
5 10 15 19

YLEALEAESITTGXA EHXQ

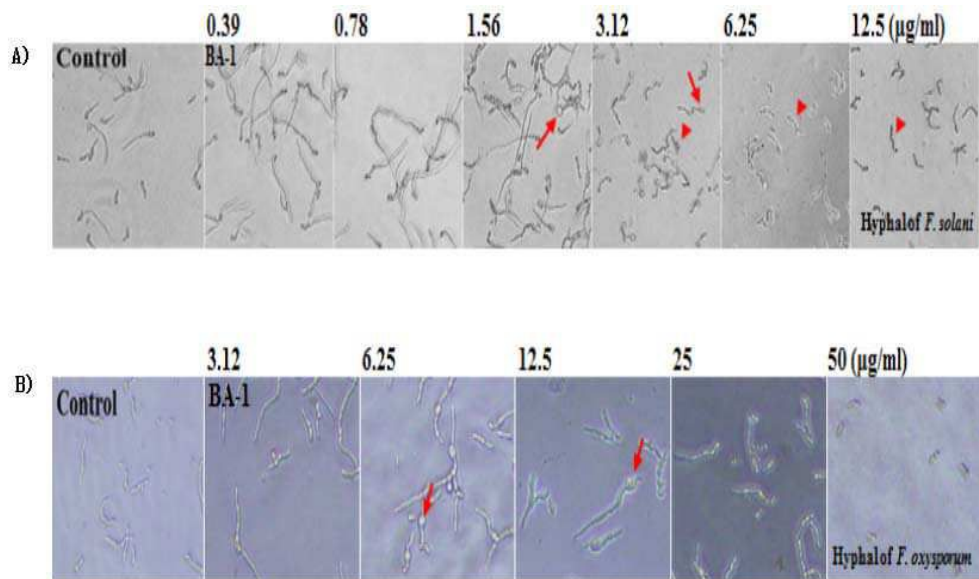
도면4



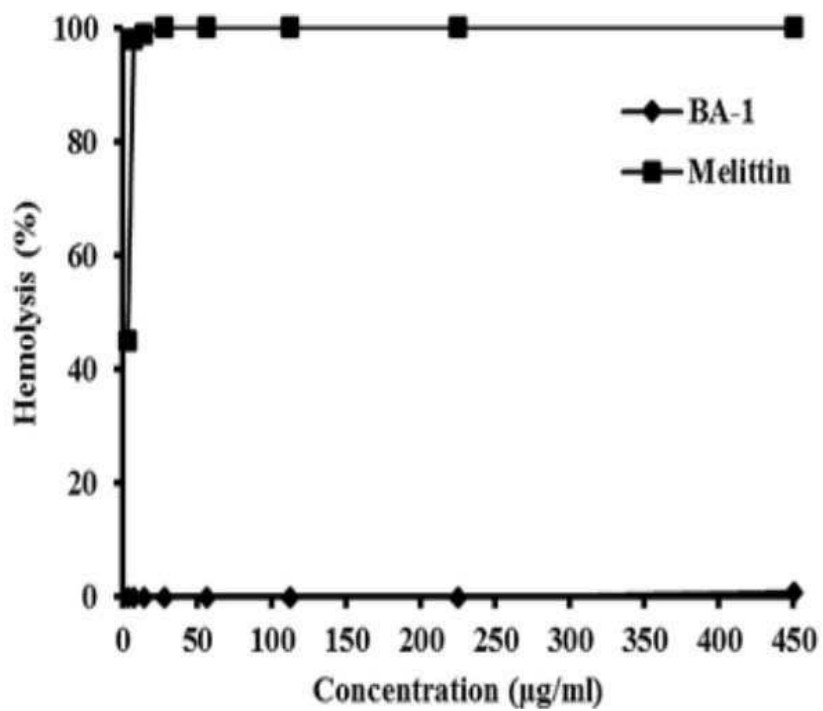
도면5



도면6



도면7



서열목록

- <110> CHOSUN UNIVERSITY
- <120> Novel antifungal peptide BA-1 isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* EML-CAP-03 and use thereof
- <130> 14P-01-15
- <160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 1

Tyr Leu Glu Ala Leu Glu Ala Glu Ser Ile Thr Thr Gly Xaa Ala Glu

1 5 10 15

His Xaa Gln