



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월08일

(11) 등록번호 10-1575732

(24) 등록일자 2015년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/08 (2006.01) A23K 1/17 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0097238

(22) 출원일자 2014년07월30일

심사청구일자 2014년07월30일

(56) 선행기술조사문헌

KR1019980702853 A

KR1020130109544 A

[논문] BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS

BLAST: 서열번호1

(73) 특허권자

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)

(72) 발명자

박남규

부산광역시 수영구 광안해변로 100, 212동 606호 (남천동, 비치아파트)

서정길

전라북도 군산시 대학로 558

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

한윤호, 양기혁, 이인행, 김남식

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 새로운 항미생물성 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 항미생물성 펩타이드에 관한 것으로서, 어류 병원성 미생물에 대하여 효율적인 항미생물 활성을 나타낼 뿐만 아니라, 양식어류에 대한 사료첨가제로 사용되거나, 항생제 대체제로 사용되더라도 어류 및 인체의 건강에 대한 위협요소를 제공하지 않는다.

대표도 - 도1

```

1       5       10      14
A A W K L L K A L A K A A L
c c c c h h h h h h c c e e
    
```

(72) 발명자

고혜진

부산광역시 영도구 절영로93번길 23-3

김군도

부산광역시 남구 분포로 111 (용호동)

김성수

부산광역시 수영구 광안해변로 100, 309동 702호
(남천동, 비치아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013000130002

부처명 환경부

연구관리전문기관 한국환경산업기술원

연구사업명 차세대 에코이노베이션 기술개발사업

연구과제명 연안 생태계 균형유지를 위한 무척추동물 고부가가치물질 활용기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2013.05.01 ~ 2016.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

항미생물 활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드.

청구항 2

제1항의 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 4

제3항의 발현 벡터를 비인간 숙주세포에 형질 전환시킨 형질전환체.

청구항 5

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항미생물제.

청구항 6

제5항에 있어서,

그람 음성균, 그람 양성균 및 진균에 대한 항균활성을 갖는, 항미생물제.

청구항 7

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항미생물성 펩타이드에 관한 것으로서, 더 상세하게는 새로운 항미생물성 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 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.

[0003] 항생제는 인간 질병을 조절하기 위해 사용되거나 식량으로 제공되는 동물의 사료첨가제로 사용되고 있다. 항생제의 사용은 병원성 세균의 감염을 회피하는데 도움을 줄 수 있지만, 세심한 주의와 조절을 필요로 한다. 이는 항생제의 사용이 항생제 내성 세균을 유도할 수 있고 특정 균주의 독성을 증가시킬 수 있으며, 이를 통해 결국 병리학적 환경을 급격하게 바꿀 수 있기 때문이다(Ervik *et al.*, Disease of Aquatic Organisms, 18: 45-51, 1994). 덧붙여, 시중에 유통되는 육류에 잔류하는 항생제의 존재는 소비자의 건강에 악영향을 미칠 수 있다(Chinabut and Puttinaowarat, *Dev. Biol. (Basel)*, 373(121): 255-261, 2005).

[0004] 척추동물 및 무척추동물들은 미생물들로부터 자기 자신들을 방어하기 위한 면역체계 및 방어시스템을 지니고 있

다. 척추동물에는 선천면역(innate immunity)과 후천면역(acquired immunity)이 각각 잘 발달되어 있지만 무척추동물에서는 선천면역만을 지니고 있다. 최근 여러 가지의 선천면역 요소들 중에서 비특이적이고 빠른 반응성을 가지는 항균활성 펩타이드에 대한 관심이 증가되고 있으며, 척추동물, 무척추동물 및 식물로부터 다양한 종류의 항균성 펩타이드가 발견되었다. 이들 항균활성을 지닌 펩타이드들은 주로 3종류의 구조적인 특징을 지니고 있다. 첫째로 알파-나선(α -helix) 구조를 취하는 물질, 둘째로 베타-시트(β -sheet) 구조를 취하는 물질, 셋째로 특정한 아미노산들이 많이 분포하고 있기 때문에 특정한 구조를 형성하지 않는 물질로 구분할 수 있다. 알파-나선 구조를 취하는 물질 중에서 비교적 분자량이 약 2000 이하인 물질에 해당하는 대표적인 항균펩타이드로 아미노산 14 잔기로 구성된 마스토파란(mastoparan) 및 아미노산 10-13 잔기로 구성된 템포린(temporins) 등이 있다. 한편 베타-시트 구조를 취하는 물질로는 대표적으로 디펜신(defensins), 타키플레신(tachyplesins) 등이 있으며, 불규칙한 구조를 형성하는 물질로는 아피다에신(apidaecins), 인돌리시딘(indolicidin) 등이 있다. 최근 이들 항균성 펩타이드를 기본 모델로 하여 강력한 항균활성을 나타내는 물질을 도출하기 위해 구조-활성간의 상관관계에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0005]

알파-나선 구조를 취하는 물질은 선형 구조를 취하고 있기 때문에 모델 펩타이드를 만들기 위해 적합한 모델로 많이 이용되고 있지만, 베타-시트 구조를 취하는 물질은 분자 내에 이황화 결합을 지니고 있기 때문에 합성 시 제약이 동반된다. 또한 불규칙한 구조를 형성하는 물질은 특정한 아미노산들을 많이 포함하고 있기 때문에 모델 펩타이드를 디자인하기 위해 충분한 조건을 지니고 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

그러나, 상기와 같은 알파-나선 구조의 항균 펩타이드들이 상당수 보고된 바 있으나, 효율적으로 항균활성을 갖고 부작용이 적은 알파-나선형의 항균 펩타이드들은 그리 많지 않은 실정이다. 본 발명은 상기 문제점을 포함하여 여러 가지 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 따라서 본 발명에서 이차구조 예측법과 나선 바퀴 다이어그램(helical wheel diagram)을 이용하여 제조되는 알파-나선 구조를 취하는 항균력이 탁월한 항균 펩타이드를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0007]

본 발명의 일 관점에 따르면, 항미생물 활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드가 제공된다.

[0008]

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드를 암호화하는 유전자가 제공된다.

[0009]

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 유전자를 포함하는 발현벡터가 제공된다.

[0010]

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 발현 벡터를 숙주세포에 형질 전환시킨 형질 전환체가 제공된다.

[0011]

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항미생물제가 제공된다.

[0012]

상기 항미생물제에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 진균에 대하여 항미생물 활성을 나타낼 수 있다.

발명의 효과

[0013]

상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따른 항균 펩타이드는 항미생물 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 양식어류에 대한 사료첨가제로 사용되거나, 사람에게 적용할 수 있는 항생제 대체제로 사용되더라도 어류 및 인체의 건강에 대한 위협요소를 제공하지 않는다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0014]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 항균 펩타이드 α AL14의 2차 구조 예측을 나타낸 이미지이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 도식된 상기 항균 펩타이드 α AL14에 대한 Schiffer-Edmundson helical

wheel diagram이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 항균 펩타이드 α AL14의 최종정제 크로마토그램의 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 항균 펩타이드 α AL14에 대한 MALDI-TOF mass 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명의 일 관점에 따르면, 항미생물 활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드가 제공된다.
- [0016] 상기 펩타이드의 C-말단은 카복실기(COOH) 또는 아민기(-NH₂)를 가질 수 있다.
- [0017] 상기 펩타이드는 그람 양성균 및 그람 음성균, 진균에 대하여 항미생물 활성을 나타낼 수 있다.
- [0018] 상기 그람 양성균은 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*), 마이크로코코스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 스트렙토코코스 이니에(*Streptococcus iniae*), 또는 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)일 수 있으며, 상기 그람 음성균은 에어로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*), 에스케리시아 콜라이(*Escherichia coli*), 엔테로박터 클로아케(*Enterobacter cloacae*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 시겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*), 또는 비브리오 파라헤모라이티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)일 수 있다. 상기 진균은 마이크로스포룸(*Microsporum* sp.), 티네아(*Tinea* sp.), 트리코파이톤(*Trichophyton* sp.), 에피더모파이톤(*Epidermophyton* sp.), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 폰세카에아 페드로소이(*Fonsecaea pedrosoi*), 슈달레스케리아 보이디(*Pseudallescheria boydii*), 바시디오볼러스 라나룸(*Basidiobolus ranarum*), 마두렐라 마이세토마티스(*Madurella mycetomatis*), 코니디오볼러스 코로나투스(*Conidiobolus coronatus*), 리노스포리디움 시베리(*Rhinosporidium seeberi*), 로보아 로보이(*Loboa loboi*), 스포로트리스 쉐키(*Sporothrix shcenckii*), 블라스토마이세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 파라코시디오이데스 프란실리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 코시디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 무코르(*Mucor* sp.), 압시디아(*Absidia* sp.), 리조푸스(*Rhizopus* sp.), 리조무코르(*Rhizomucor* sp.), 또는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0020] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터가 제공된다.
- [0021] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 발현 벡터를 숙주세포에 형질 전환시킨 형질 전환체가 제공된다.
- [0022] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항미생물제가 제공된다.
- [0023] 상기 항미생물제에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 진균에 대하여 항미생물 활성을 나타낼 수 있다.
- [0024] 상기 그람 양성균은 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*), 마이크로코코스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 스트렙토코코스 이니에(*Streptococcus iniae*), 또는 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)일 수 있으며, 상기 그람 음성균은 에어로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*), 에스케리시아 콜라이(*Escherichia coli*), 엔테로박터 클로아케(*Enterobacter cloacae*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 시겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*), 또는 비브리오 파라헤모라이티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)일 수 있다. 상기 진균은 마이크로스포룸(*Microsporum* sp.), 티네아(*Tinea* sp.), 트리코파이톤(*Trichophyton* sp.), 에피더모파이톤(*Epidermophyton* sp.), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 폰세카에아 페드로소이(*Fonsecaea pedrosoi*), 슈달레스케리아 보이디(*Pseudallescheria boydii*), 바시디오볼러스 라나룸(*Basidiobolus ranarum*), 마두렐라 마이세토마티스(*Madurella mycetomatis*), 코니디오볼러스 코로나투스(*Conidiobolus coronatus*), 리노스포리디움 시베리(*Rhinosporidium seeberi*), 로보아 로보이(*Loboa loboi*), 스포로트리스 쉐키(*Sporothrix shcenckii*), 블라스토

마이세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 파라코시디오이데스 브란실리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 코시디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 크립토코커스 네오파르만스(*Cryptococcus neoformans*), 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 무코르(*Mucor* sp.), 압시디아(*Absidia* sp.), 리조푸스(*Rhizopus* sp.), 리조무코르(*Rhizomucor* sp.), 또는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)일 수 있다.

[0025] 상기 항미생물제에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 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 바람직하다.

[0026] 상기 항미생물제에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드의 유효 투여량은 0.1 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.

[0027] 상기 항미생물제에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드는 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여 시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관 내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제가 제공된다.

[0029] 상기 사료첨가제에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드 또는 이의 변이체는 그람 양성균, 그람 음성균 및 진균에 대하여 항미생물 활성을 나타낼 수 있다.

[0030] 상기 그람 양성균은 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*), 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*), 또는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)일 수 있으며, 상기 그람 음성균은 에어로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 엔테로박터 클로아케(*Enterobacter cloacae*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 시겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*), 또는 비브리오 파라헤모라이티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)일 수 있다. 상기 진균은 마이크로스포룸(*Microsporium* sp.), 티네아(*Tinea* sp.), 트리코파이톤(*Trichophyton* sp.), 에피데르모파이톤(*Epidermophyton* sp.), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 폰세카에아 페드로소이(*Fonsecaea pedrosoi*), 슈달레스케리아 보이디(*Pseudallescheria boydii*), 바시디오볼러스 라나룸(*Basidiobolus ranarum*), 마두렐라 마이세토마티스(*Madurella mycetomatis*), 코니디오볼러스 코로나투스(*Conidiobolus coronatus*), 리노스포리디움 시베리(*Rhinosporidium seeberi*), 로보아 로보이(*Loboa loboi*), 스포로트리스 쉐켄키(*Sporothrix shcenckii*), 블라스토마이세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 파라코시디오이데스 브란실리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 코시디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 크립토코커스 네오파르만스(*Cryptococcus neoformans*), 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 무코르(*Mucor* sp.), 압시디아(*Absidia* sp.), 리조푸스(*Rhizopus* sp.), 리조무코르(*Rhizomucor* sp.), 또는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)일 수 있다.

[0031] 상기 사료첨가제에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 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 바람직하다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드는 어류가 양식되고 있는 수조의 물에 직접 살포하는 것도 가능하다.

[0033] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0034] 실시예 1: 항균활성 펩타이드 α AL14의 디자인

[0035] 자연에서 정제된 항균성 펩타이드들은 주로 α -helix, β -sheet 또는 특정 아미노산 잔기를 많이 포함하고 있는 불특정구조의 3종류로 나눌 수 있다. 본 연구에서는 항균활성이 우수한 펩타이드를 개발하고자 α -helix를 취하는 동시에 C말단이 아마이드화된 양친매성을 이루는 모델펩타이드를 디자인하였다.

[0036]

디자인한 항균활성 펩타이드 α AL14는 14개의 아미노산과 C말단을 아마이드화한 AAWKLLKALAKAAL-NH₂이다. ExPASy tools server의 ProtParam1 tool (://web.expasy.org/protparam/)을 사용하여 이 물질의 physiological parameter를 측정된 결과, 화학식(Formula)은 C₇₁H₁₂₃N₁₉O₁₄로서 분자량 이론치 1466.8 Da을 나타내었으며, 순전하값이 4이었다. ExPASy tools server의 GOR program(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)을 이용하여 2차 구조를 예측한 결과, α AL14는 N-말단 및 C-말단부에서 돌출 가닥(extended strands)과 무작위 코일(random coils)을 형성하는 반면에, 중앙부위(잔기 5-10)는 알파-나선 구조를 취하며(도 1), pI 값이 10.30인 염기성 펩타이드이다. DNAsis ver 2.5 소프트웨어를 이용하여 Chou and Fasman 방법으로 물질의 Schiffer-Edmundson helical wheel diagram을 그려본 결과, 알파-나선 구조를 취하면서 양친매성을 지니는 특징을 나타내고 있다(도 2). 본 발명에서 이차구조 예측법과 나선 바퀴 다이어그램을 이용하여 14개의 아미노산으로 구성된 알파-나선 구조를 취하는 항균력이 탁월한 모델 펩타이드를 합성하였다. 합성한 펩타이드의 서열은 AAWKLLKALAKAAL-NH₂(서열번호 1)이다. 이 물질은 α -나선 구조를 취하면서 14개의 아미노산으로 구성되어 있기 때문에 편의상 α AL14로 명명하였다.

[0037]

실시예 2: α AL14의 합성, 정제 및 분자량 확인

[0038]

종래에 보고된 고상합성법을 이용하여 α AL14를 합성하였으며(Merrifield *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 85(14): 2149-2154, 1963)역상 HPLC를 이용하여 최종 정제를 수행하였고, 정제된 물질은 동결건조를 수행한 후에 -70℃에서 보관하였다. 합성 후 정제된 펩타이드의 분자량을 MALDI-TOF-MS Spectrometer(Voyager-DETM PRO, Perseptive Biosystems, USA)를 이용하여 측정하였다. 분자량 측정시 매질로는 α -cyano-4-hydroxycinamic acid를 사용하였다. HPLC에는 역상 CapCell-Pak C₁₈ column (4.6 x 150 mm, 5 μ m, Shiseido, Japan)을 사용하였다. 분리조건 하기와 같다: A용매는 0.1% TFA가 포함된 H₂O를, B용매는 0.1% TFA가 포함된 CH₃CN를 사용하였으며, B 용매의 농도구배를 최초 2분간은 B 용매의 CH₃CN 농도구배를 0%에서 30%로, 이후 10분간은 30%에서 60%까지, 그리고 최종 2분간은 60%에서 90%까지 아세토니트릴의 농도를 상승시켰고, 유속 1 ml/min로 수행하였으며, 용출되는 물질은 220nm에서 검출하여 정제하였다(도 3). 정제한 α AL14의 분자량을 측정된 결과, 1467.3 Da으로 합성값과 이론치(1466.8 Da)가 잘 일치되었다(도 4).

[0039]

실시예 4: 항균활성 측정

[0040]

본 발명의 일 실시예에서 합성한 항균 펩타이드의 항균활성을 확인하기 위해서 초민감성 방사 확산분석(ultrasensitive radial diffusion assay, URDA)법을 사용하여 7가지의 그람 양성균(Gram-positive bacteria), 그람 음성균(Gram-negative bacteria), 어병세균 및 효모인 *Candida albicans*에 대한 항균활성을 측정하였다. 이때 그람 양성균으로는 *Bacillus subtilis* KCTC 1021, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 및 *Staphylococcus aureus* RM4220을 사용하였고, 그람 음성균으로는 *Escherchia coli* D31, *Enterobacter cloacae* KCTC1685, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC2004 및 *Salmonella enterica* KCTC 2514를 사용하였다. 그리고 효모로는 *Candida albicans* KCTC7965를 사용하였으며, 어병세균으로는 *Streptococcus iniae* FP5229, *Aeromonas hydrophila* KCTC2358, *Vibrio alginolyticus*를 사용하였다.

[0041]

분석에 앞서 *A. hydrophila*, *S. iniae* 그리고 *V. alginolyticus*는 25℃에서, 그 외 다른 균주들은 37℃에서 16시간 동안 Trypticase soy broth(TSB)에서 배양하였다. 한편 *Candida albicans*는 37℃에서 16시간 동안 Sabouraud's dextrose broth (SDB)에서 배양하였다. 그 후, 상기 세균과 *C. albicans* 현탁액은 McFarland turbidity standard of 0.5(Vitek Colorimeter # 52-1210; Hach, Loveland, CO, USA)로 희석하였다. 이 값은 약 $\sim 10^8$ CFU/ml, *C. albicans*는 10^6 CFU/ml에 해당하는 양을 나타낸다. 상기 희석액은 각각 0.5 ml의 희석된 세균 현탁액을 9.5 ml의 깔개 겔[underlay gel, 10 mM 인산 완충액(pH 6.57), 0.03% TSB 또는 0.03% SDB 및 1% I형 한천(low EEO)]에 혼합하여 세균의 경우는 5×10^6 CFU/ml로 만들어주고, *C. albicans*의 경우는 5×10^4 CFU/ml로 조정 한 후, 직경 10 cm, 높이 1.5 cm 평판 접시에 도포하여 1 mm 높이의 겔을 형성하였다. 그 후, 상기 평판 접시 내에 형성된 겔에 직경 2.5 mm 크기로 구멍을 뚫어 웰(well)을 만들었다. 합성 펩타이드, α AL14는 1 mg/ml의 농도로 만든 다음 0.01% 초산 3 μ l에 2배씩 순차적으로 희석한 후 1 mm 두께의 깔개 겔 내에 형성된 직경 2.5 mm의 웰에 각 희석액을 첨가한 후, 실온에서 정치시켜 흡수시켰다. 첨가한 각 농도의 펩타이드 희석액들이 완전히 흡수된 후 세균 또는 *C. albicans*의 깔개 겔 위에 10 mM 인산완충용액(pH 6.57)에 6% TSB 또는 6% SDB 및 1% 한천을 포함하는 농도 두 배의 덮개 겔 10 ml을 부어서 굳힌 뒤 추가적으로 16-18시간 동안 배양한 후 투명지역(clear zone)의 직경을 측정하였다. 웰의 직경을 제한 후 투명 지역의 직경을 유니트(U)로

표현하여 0.1 mm을 1U로 환산하였고, 합성 펩타이드의 MEC(최소 효과 농도, $\mu\text{g/ml}$)는 펩타이드 농도의 로그값에 대한 유니트의 곡선의 X-intercept로 계산하였다(Zhao *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 2695-2702, 2001). 양성 대조군으로는 교잡종 줄무늬 베스(hybrid striped bass, *Morone saxatilis* x *M. chrysops*)로부터 분리된 α -나선형의 항균 펩타이드인 피시딘 1(piscidin 1)을 사용하였다 (Silphaduang and Noga *et al.*, *Nature*, 414: 268-269, 2001).

[0042]

α AL14를 그람 양성균인 *B. subtilis* KCTC 1021, *M. luteus* ATCC 9341 및 *S. RM4220*과 그람 음성균인 *E. coli* D31, *E. cloacae* KCTC1685, *P. aeruginosa* KCTC2004, *S. enterica* KCTC 2514와 효모인 *C. albicans* KCTC7965에 대해 항미생물 활성을 측정한 결과, 양성 대조군으로 사용한 α -나선형의 항균 펩타이드인 피시딘 1(piscidin 1)보다 강한 항미생물 활성을 (MECs: 1.8-3.1 $\mu\text{g/ml}$) 나타내었다(표 2). 특히, α AL14는 피시딘 1보다 *C. albicans*에 대해 높은 활성을 나타내었다. 또한 어병세균인 *Streptococcus iniae* FP5229, *Aeromonas hydrophila* KCTC2358, *Vibrio alginolyticus*에 대해서도 MEC 값이 1.7-2.3 $\mu\text{g/ml}$ 의 값으로 Piscidin 1보다 약 3-4배 강한 활성을 나타내었다 (표 3). 이들 결과로부터 합성 펩타이드인 α AL14는 강한 항미생물에 대해 강한 활성을 나타내었다. 따라서 이러한 결과는 새로운 항생제 개발에 기초자료를 제공하며, 뿐만 아니라 식품첨가제 등을 비롯한 다양한 용도로 사용 가능하리라 생각된다.

표 1

[0043]

아미노산 서열	길이	충전하/pI	계산 분자량	이차구조
1 5 10 14 AAWKLLKALAKAAL-NH ₂	14	4/10.30	1466.8	α -helix

표 2

[0044]

α AL14와 피시딘(piscidin 1)의 항균활성

미생물	그람 염색여부	최소유효농도(g/ml)	
		AL14	피시딘 1
<i>B. subtilis</i> KCTC1021	+	1.8	7.5
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	+	2.5	4.5
<i>S. aureus</i> RM4220	+	2.4	8.0
<i>E. coli</i> D31	-	2.1	4.4
<i>E. cloacae</i> KCTC1685	-	2.5	3.8
<i>P. aeruginosa</i> KCTC2004	-	2.8	7.0
<i>S. enterica</i> KCTC2514	-	2.2	6.0
효모			
<i>C. albicans</i> KCTC7965		3.1	> 62.5

표 3

[0045]

α AL14와 피시딘(piscidin 1)의 어병세균에 대한 항균활성

미생물	그람염색여부	최소유효농도(g/ml)	
		AL14	피시딘 1
<i>S. iniae</i> FP5229	+	2.3	8.0
<i>A. hydrophila</i> KCTC2358	-	1.7	4.6
<i>V. alginolyticus</i>	-	2.6	8.0

[0046]

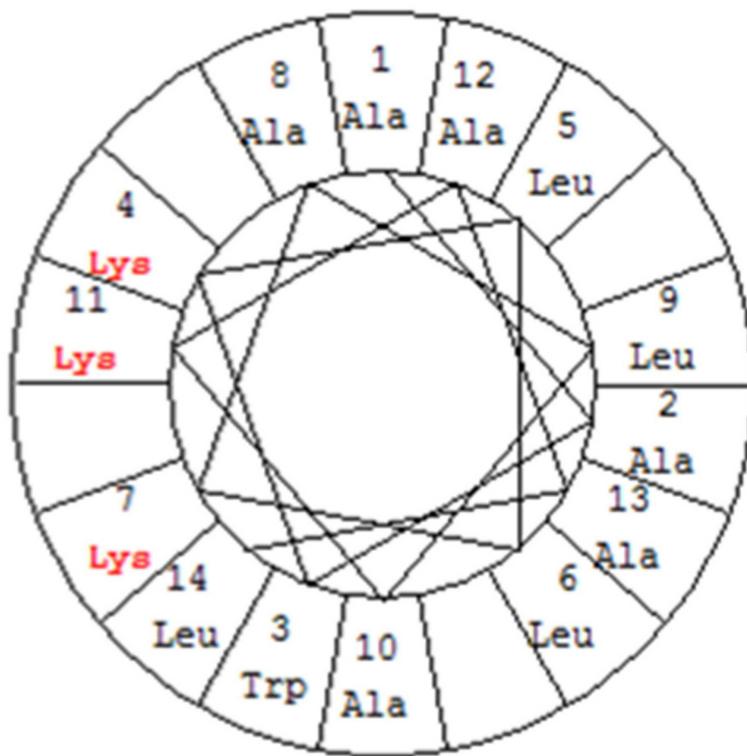
본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

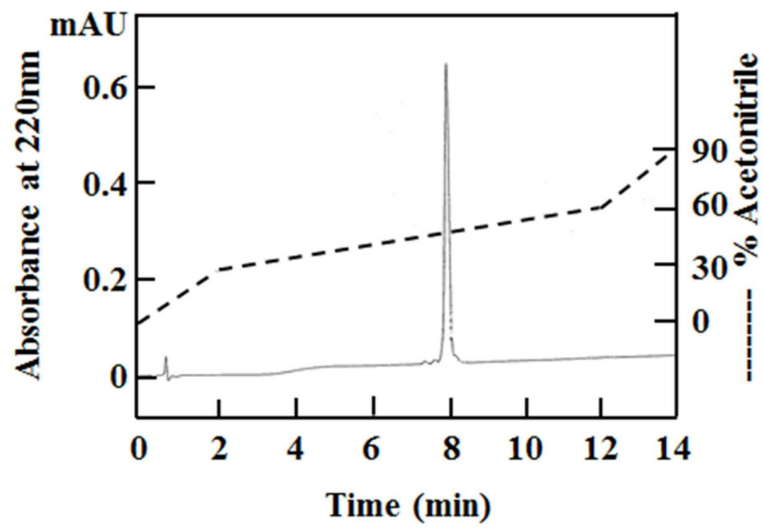
도면1

1		5		10		14							
A	A	W	K	L	L	K	A	L	A	K	A	A	L
c	c	c	c	h	h	h	h	h	h	c	c	e	e

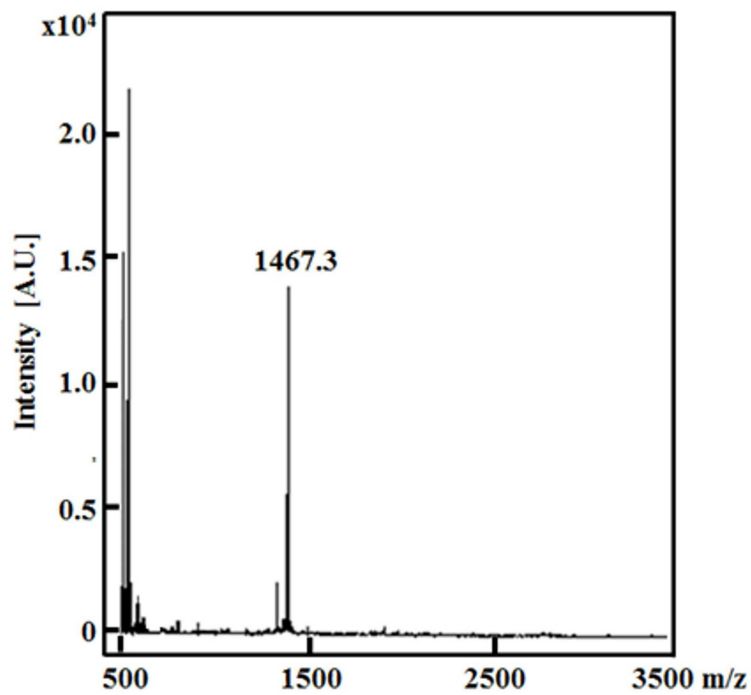
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
- <120> Novel antimicrobial peptide and uses thereof
- <160> 1
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesis antimicrobial protein

<400> 1

Ala Ala Trp Lys Leu Leu Lys Ala Leu Ala Lys Ala Ala Leu

1

5

10