(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0012463
(43) 공개일자 2015년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) *C07K 1/14* (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0088003
(22) 출원일자 2013년07월25일
심사청구일자 2013년07월25일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
유진철
광주광역시 남구 광복마을길 53, 101동 1202호 (진월동, 새한아파트)
최윤희
광주 북구 자미로39번길 23, 301호 (신안동, 월드빌)
조승식
광주 남구 회재로1186번길 52, 102동 1103호 (주월동, 현대1차아파트)
(74) 대리인
최성용

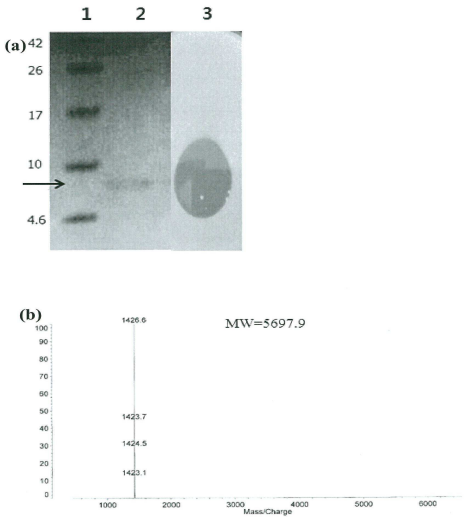
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **바실러스 균주 유래의 항미생물 활성 및 항염증성의 양기능성 펩타이드 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 한국 전통 발효 식품인 김치에서 분리한 바실러스 균주에 의해 생산되고, 항균 및 항염증성의 양기능성 펩타이드 및 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 양기능성 펩타이드는 바실러스 속 CS32(균주기탁번호 KCTC 18250P)는 김치로부터 분리하고, 90 ℃ 이하 및 pH 5.0-12.0에서 안정된 것으로서, 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA), 반코마이신 내성 황색포도상구균 (VRSA) 및 반코마이신 내성 엔테로코시(VRE)를 포함하는 다약제 내성(MDR) 세균에 대해 항생 활성을 나타냄과 동시에 LPS에 의해 유도된 iNOS 및 COX-2 유전자 및 단백질 발현, 사이토카인 생산을 억제하는 항염증 작용을 나타내므로, 상기 펩타이드는 항생제 또는 항염증제로서 효율적으로 사용될 가능성이 매우 높다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395034285
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21
연구과제명 유용펩타이드 생산 미생물 대량 발효, 시제품 생산
기 여 율 0.5/1
주관기관 조선대학교 산학협력단
연구기간 2013.02.01 ~ 2013.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345169663
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원
연구과제명 동물 사료용 항생제 대체제에 대한 체계적 과학적 연구
기 여 율 0.5/1
주관기관 조선대학교
연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

바실러스 속 CS32(균주기탁번호 KCTC 18250P)는 한국 전통 발효식품인 김치로부터 분리되고, N-말단으로부터 처음 12 아미노산 잔기는 A-P-L-E-I-X-X-I-F-H-D-N(서열번호 1)이고 분자량이 5697.9 Da이며, 90 ℃ 이하 및 pH 5.0 ~ 12.0에서 안정하며, 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA), 반코마이신 내성 황색포도상구균 (VRSA) 및 반코마이신 내성 엔테로코시(VRE)를 포함하는 다약제 내성(MDR) 세균에 대해 항균 활성을 나타냄과 동시에 LPS에 의해 유도된 iNOS 및 COX-2 유전자 및 단백질 발현, 사이토카인 생산을 억제하는 항염증 작용을 나타내는 것을 특징으로 하는 항미생물성 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*)의 것과 가장 높은 16S rRNA 상동성(99.392%)을 나타내는 것을 특징으로 하는 항미생물성 펩타이드.

청구항 3

제1항에 따른 펩타이드를 유효 성분으로 포함하는 항생제 또는 항염증제.

청구항 4

제1항에 있어서, N-말단의 처음 12개의 아미노산이 서열번호 1의 것인 항미생물성 펩타이드.

청구항 5

바실러스 속 CS32를 글루코오스-비프 추출물-펩톤 배지(1% 글루코오스, 0.5% 비프 추출물 및 0.5% 펩톤)에서 60 시간 동안 배양하는 단계;

세포들을 30분 동안 4℃에서 6000 rpm으로 원심분리에 의해 제거하고, 상층액 중의 펩타이드를 60% 포화도의 황산 암모늄으로 4 ℃에서 밤새 침전시키는 단계;

침전물을 4 ℃에서 6,000 rpm, 60 분 동안 원심분리하여 모으고, 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0) 중에 현탁시키고, 1 kDa 컷-오프 멤브레인(Millipore)을 사용하여 투석시키는 단계;

조 추출물들을 Sepharose CL-6B 컬럼에 이어서 Sephadex G50 컬럼에 가하고, 상기 완충액으로 분리, 용출하는 단계; 및

활성 분획들을 모으고 농축시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 바실러스 속 균주로부터 제1항에 따른 항미생물 활성과 항염증성 작용을 나타내는 이기능성 펩타이드의 생산 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 한국 전통 발효 식품인 김치에서 분리한 바실러스 균주에 의해 생산되는 항균 및 항염증성의 양기능성 펩타이드 및 그의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 항균 펩타이드(AMPs)는 세균을 포함한 다양한 미생물에 의해 분비되고 그들 자신을 다른 미생물로부터 보호하는 역할을 한다[참조문헌 1]. 이들 펩타이드는 10-40 잔기의 폴리펩타이드로 구성되며, 본래의 면역 반응의 활성 요소에 영향을 미친다.

[0003] 또한, 이런 항균펩타이드는 병원균을 포함하는 그람 음성 및 그람 양성 세균, 마이코박테리아, 프로토조아, 바이러스, 균류 및 암세포를 죽일 수 있는 활성을 보이는 것으로 확인되었다[참조문헌: 2]. 바실러스(*Bacillus* sp.)는 호기성의 막대기 모양을 가진 그람 양성균으로 내성포자를 형성하며 항균물질을 생산할 뿐만 아니라 다수의 세포외 효소를 생산함으로 인해 발효 산업에서 널리 사용되어 오고 있다 [참조문헌: 3-12].

[0004] 염증은 병원균, 혈관 조직의 손상된 세포 및 다양한 자극원에 대한 복합적인 생물학적 방어반응으로[참조문헌: 13], 염증반응 과정에서 활성화된 염증성 세포들은 증가된 양의 일산화질소(NO)와 인터류킨 IL-1β, IL-6 등의 사이토카인 및 종양 괴사 인자 (TNF)-α 등을 분비한다[참조문헌: 15]. 염증 반응 시 일산화질소가 주된 생성물로 그의 생성은 산화질소 합성 효소(iNOS)에 의해 조절된다. iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 활성화 되면 장시간 동안 다량의 일산화질소를 생성하며, 생성된 일산화질소는 염증 반응을 촉진시켜 염증을 심화시킨다. 염증 반응이 일어나는 동안, 대식세포는 iNOS, COX-2 및 TNF- α, IL-1β, IL-6 등의 염증에 관련된 사이토카인류 및 염증성 매개자들을 과잉생산하고 면역반응에 있어서 중요한 역할을 수행한다[참조문헌: 15-16].

[0005] 본 발명자들은 치료 용도를 갖는 미생물성 펩타이드를 개발할 목적으로 항균 펩타이드 생산 균주를 한국의 전통식품인 김치로부터 분리하여 바실러스 속(*Bacillus* sp.) CS32로 명명하고, 생산된 항균 펩타이드의 특성과 항미생물 및 항염증성 활성을 평가하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 문헌 1: Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. Biochem Pharmacol. 1999;58:759-65.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 한국 전통 발효 식품인 김치로부터 기능성 물질을 탐색하기 위하여 예의 연구한 결과, 후술하는 바와 같이 전통식품에서 분리한 바실러스 균주에 의해 생산되는 항균 펩타이드가 양기능성을 나타내고 이것이 효율적인 항생제 및 항염증제로 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 김치로부터 분리한 바실러스 균주 및 이 균주에 의해 생산되고, 다약제내성 세균에 대해 항균활성 및 항염증성 작용을 동시에 나타내는 신규 펩타이드 및 이것의 용도를 제공한다.

[0009] 본 발명이 해결하려는 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 양기능성 펩타이드는 바실러스 속 CS32(균주기탁번호 KCTC 18250P)로 한국의 전통 발효 식품인 김치로부터 분리하였다. 이 바실러스가 생산하는 펩타이드는 90 ℃ 이하 및 pH 5.0-12.0에서 안정하며, 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA), 반코마이신 내성 황색포도상구균 (VRSA) 및 반코마이신 내성 엔테로코시(VRE)를 포함하는 다약제 내성(MDR) 세균에 대해 항균 활성을 나타냄과 동시에 LPS에 의해 유도되는 iNOS와 COX-2 유전자 및 단백질 발현, 사이토카인 생산을 억제하는 항염증 작용을 나타내므로, 상기 펩타이드는 항생제 또는 항염증제로서 효율적으로 사용될 가능성이 매우 높다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 바실러스 속 CS32의 계통수.

도 2는 바실러스 속 CS32의 컬럼 크로마토 그래피 용출 프로필을 나타내는 그라프도.

도 3은 분자량 확인을 위한 Tricine SDS-PAGE 사진 및 MALDI-TOF 그라프도.

도 4는 세포 생존능에 미치는 CSP32의 영향을 나타내는 그라프도.

도 5는 Raw 264.7 대식 세포에서 LPS에 의해 유도된 일산화질소 및 염증 관련 단백질의 영향을 나타내는 그라프

및 사진도면.

도 6은 LPS에 의해 유도된 Raw 264.7 대식구 세포에서 TNF-α, IL-1β, IL-6 사이토카인의 생산의 억제에 미치는 CSP32의 효과를 나타내는 그라프도.

도 7은 LPS-유도된 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA 유전자 발현에 미치는 CSP32의 효과를 나타내는 사진도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 한국 전통 발효 식품인 김치에서 분리한 바실러스 속 CS32(균주기탁번호 KCTC 18250P)가 생산하는 항균 및 항염 펩타이드에 관한 것이다.

[0013] 이 펩타이드는 분자량이 5697.9 Da이며 N-말단 염기서열 분석 결과 다음과 같은 아미노산 서열을 가진다(A-P-L-E-I-X-X-I-F-H-D-N(서열번호 1)). 온도와 pH 안정성에서 90 ℃ 이하 및 pH 5.0-12.0에서 안정하며, 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA), 반코마이신 내성 황색포도상구균 (VRSA) 및 반코마이신 내성 엔테로코시(VRE)를 포함하는 다약제 내성(MDR) 세균에 대해 항균 활성을 나타냄과 동시에 LPS에 의해 유도된 iNOS와 COX-2 유전자 및 단백질 발현, 염증 관련 사이토카인 생산을 억제하는 항염증 작용을 나타내는 것을 특징으로 하는 항미생물성 펩타이드를 제공한다.

[0014] 본 발명은, 추가의 일면에 있어서, 상기 펩타이드를 유효 성분으로 포함하는 항생제 또는 항염증제를 제공한다.

[0015] 본 발명은, 다른 추가의 일면에 있어서, 바실러스 속 CS32를 글루코오스-비프 추출물-펩톤 배지(1% 글루코오스, 0.5% 비프 추출물 및 0.5% 펩톤)에서 60 시간 동안 배양하는 단계;

[0016] 배양 후 세포들을 4 ℃에서 6000 rpm으로 원심분리에 의해 제거하고, 배양 상층액 에 60% 포화도의 황산 암모늄으로 4 ℃에서 유효 펩타이드를 침전시키는 단계;

[0017] 침전물을 4 ℃에서 6,000 rpm, 60분 동안 원심분리하여 모으고, 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0) 중에 현탁시키고, 1 kDa 컷-오프 멤브레인(Millipore)을 사용하여 투석 및 농축시키는 단계;

[0018] 조 추출물들을 Sepharose CL-6B 컬럼에 이어서 Sephadex G50 컬럼에 가하고, 상기 완충액으로 분리, 용출하는 단계; 및

[0019] 활성 분획들을 모으고 농축시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 바실러스 속 균주로부터 제1항에 따른 항미생물 활성과 항염증성 작용을 나타내는 이기능성 펩타이드의 생산 방법을 제공한다.

[0020] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.

[0021] 본 발명자들은 치료 용도를 갖는 미생물성 펩타이드를 개발할 목적으로, 항균능력을 가진 펩타이드를 생산하는 균주를 전통 한국 음식인 김치에서 분리하여 바실러스 속 CS32(균주기탁번호 KCTC 18250P)로 명명하였다. 이 균주에 의해 생산된 분자량 5697.9 Da을 갖는 항미생물 및 항염증성 펩타이드(CSP32)를 정제하여 특성화하였다. CSP32의 N-말단의 아미노산 염기서열은 APLEIXXIFHDN(서열번호 1)이었다. CSP32는 다양한 화학약품 뿐만 아니라 지질분해효소, 프로테나아제 K, α-키모트립신 및 트립신, 다양한 범위의 pH (5-10) 및 온도(90 ℃ 이하)에 대하여 안정하였다. CSP32는 메티실린-내성 황색포도상구균, 반코마이신-내성 황색포도상구균, 반코마이신-내성 엔테로코코시 등의 다약제 내성(MDR) 세균에 대하여 항미생물 활성을 나타내었는데, 최소 저지 농도의 범위는 0.156 ~ 80 μg/ml이었다. 또한, CSP32는 대식세포인 Raw 264.7에서 LPS에 의해 활성화 되어 증가된 일산화질소의 생산을 농도 의존적으로 억제하는 효능을 나타내었다. 또한, 염증 관련 단백질 및 mRNA 유전자 수준 모두에서 LPS에 의해서 유도된 유도성 질산화물(iNOS) 및 사이클로옥시게나아제-2 (COX-2)의 발현을 농도 의존적으로 억제하였다.

[0022] 종양 괴사 인자-α(TNF-α), 인터류킨-6 (IL-6) 및 IL-1β의 방출 및 이들 사이토카인의 mRNA 발현 레벨 또한 CSP32에 의해 농도 의존적으로 감소되었는데, 이는 CSP32의 항-염증성 특성이 Raw 264.7 세포에서 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6 및 IL-1β의 단백질과 유전자의 발현에 영향을 주었음을 의미한다.

[0023] 양기능성 활성을 가진 CSP32는 염증관련 질환 및 MDR 병원균의 치료에 있어서 치료 가능성을 갖는다.

[0024] 이러한 항생제 및 항염증제의 적용대상은 명확한 것이고, 당해 분야에 공지된 바의 통상의 방법을 준용하여 적

용할 수 있다.

[0025] 본 발명에 따른 제약 조성물은 약학적으로 허용가능한 결합제(예, 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시프로필셀룰로오스), 붕해제(예, 카복시메틸셀룰로오스칼슘, 전분글리콜산나트륨), 희석제(예, 옥수수전분, 유당, 콩기름, 결정셀룰로오스, 만니톨), 활택제(예, 스테아린산 마그네슘, 탈크), 감미제(예, 백당, 과당, 솔비톨, 아스파탐), 안정제(카복시메틸셀룰로오스나트륨, 알파 또는 베타 싸이클로덱스트린, 비타민 C, 구연산, 백납), 보존료(예, 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 안식향산나트륨) 및 향료(예, 에틸바닐린, 마스킹후레바, 멘톨후라보노, 허브향)와 혼합하여 정제, 캅셀제, 연질캅셀제, 액제, 연고제 또는 주사제와 같은 약학적 제제로 제조될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 경구제 또는 비경구제의 형태로 투여하는 것이 바람직할 수 있다.

[0026] 본 발명의 제약 조성물의 복용량은, 그 제제 형태, 투여 방법, 사용 목적 및 이것에 적용되는 개인의 연령, 체중, 증상에 따라서 적절히 설정되고, 일정하지 않지만 일반적으로는 제제 중에 함유되는 유효성분의 양은 성인 1일당 예컨대 1 mg~2000 mg/kg이다. 물론 복용량은, 각종 조건에 의해서 변동하기 때문에, 상기 범위 보다 적은 양으로 충분한 경우도 있고, 또는 범위를 초과하여 필요한 경우도 있다.

[0027] <유효량>

[0028] 본 발명에 있어서의 약제학적 조성물 중 유효성분인 펩티드의 투여량은 환자의 연령, 성별, 증상, 투여방법 또는 예방목적에 따라, 체중 kg 당 1 내지 2,000 ㎎을 일일 1회 내지 3회 분복할 수 있다. 특이 증상을 나타내는 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여 시간, 투여 방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 당업자가 투여량을 변화시킬 수도 있다.

[0029] <실시예>

[0030] 이하, 본 발명은 다음의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명이 이들 실시예에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[0031] 후술하는 실시예에서 사용된 재료 중, 세파로오스(Sepharose) CL-6B 및 세파덱스(Sephadex) G-50는 파마시아사(Pharmacia, Uppsala, Sweden)로부터 입수하였다. 트립신, 프로테이나제 K, α-키모트립신, 지질분해효소 Sigma (St. Louis, USA)로 구매하였다. 리포폴리사카라이드(LPS), 디메틸 술폭시드(DMSO), Griess 시약 및 3-(4,5-디메틸티아졸-2-2,5-디페닐테트라졸리늄 브로마이드(MTT) 역시 시그마사로부터 구매하였다. Dulbecco's 변형 Eagle's 배지(DMEM), 태아 송아지 혈청(FBS), 및 페니실린-스트렙토마이신 용액은 Invitrogen (Grand Island, NY, USA)으로부터 구매하였다. 토끼 항-마우스 iNOS 다클론 항체는 Santa Cruz Biotech Inc. (Santa Cruz, CA, USA)로부터 입수하였고, 항-마우스 COX-2는 Cayman Co.로부터 입수하였다. HRP-공액 당나귀 항-토끼 Ig-G 및 항-마우스 IgG는 Cell signaling으로부터 구매하였다. 알칼린 포스파타제 공액 affinipure 당나귀 항 마우스 IgG는 Jackson Immuno-research laboratories INC로부터 구매하였다. Mouse TNF-α, IL-6, IL-1B, ELISA 키트는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)로부터 구매하였다. 기타 모든 화학약품은 및 시약은 분석 등급을 사용하였다.

[0032] **실시예 1: 바실러스 속 CS32의 스크리닝 및 배양**

[0033] 한국의 전통 식품 샘플들을 전라남도의 여러 지역에서 수집하였다. 상기 식품 샘플들을 증류수에 현탁시키고 희석한 후, *Bacillus* 분리용 배지 (MRS, Muller Hinton)에 접종시켰다.

[0034] 분리된 바실러스 균주는 병원성 미생물에 대한 항균활성을 확인하기 위하여 페이퍼 디스크 확산법을 이용하였으며, 활성은 저지환의 직경에 의하여 확인하였다. 본 균주의 동정을 위하여 16s rRNA 서열 분석법인 Bergey's '*Manual of systemic bacteriology*'에 따라 수행하였다[참조문헌: 17]. 이 균주의 항균 펩타이드 생산은 몇가지 탄소원 및 질소원을 사용함으로써 최적화시켰다. 항균 펩타이드 생산에 미치는 다양한 탄소원의 영향은 글루코오스, 만니톨, 전분, 락토오스, 프락토오스, 소르비톨, 수크로오스 또는 말토오스 각 1%와 1% 효모 추출물이 포함된 배지를 사용하여 결정하였다. 배양은 250 ml Erlenmeyer 플라스크에 50 ml의 배지를 넣고 37℃에서 180 rpm으로 지속적으로 진탕하면서 수행하였다. 이어서, 펩타이드 생산에 대한 질소원의 영향은 비프 추출물, 말트, 트립톤, 효모 추출물, 오트밀, 대두유, 펩톤 각 1%와 1% 글루코오스(최적 탄소원)를 함유한 배지를 사용하여 결정하였다.

[0035] 형태학적 및 생화학적 특성을 분석한 결과 균주 CS32는 바실러스 균주인 것으로 나타났다(데이터는 나타내지 않음). 이어서 16S rRNA 서열분석을 통하여 밀접하게 연관된 바실러스 종의 서열과 비교하였다. 세균 데이터베이스에 대한 컴퓨터 보조 RNA 검색 결과, CS32의 16S rRNA 서열은 *Bacillus licheniformis*와 99.392%의 상동성을 나타내었다(표 1 참조). 서열 정렬에 기초한 계통수는 도 1에 나타내었다. 도 1은 바실러스 속 CS32의 계통수이다.

표 1

[0036]

	명칭	균주	입수번호	유사성	전체핵산 차이
1	*Bacillus licheniformis*	ATCC 14580(T)	CP000002	99.392	9/1480
2	*Bacillus sonorensis*	NRRL B-23154(T)	AF302118	99.362	9/1410
3	*Bacillus aerius*	24K(T)	AJ831843	99.323	10/1478
4	*Bacillus subtilis subsp. spizizenii*	NRRL B-23049(T)	AF074970	98.652	19/1409
5	*Bacillus mojavensis*	IFO 15718(T)	AB021191	98.648	20/1479
6	*Brevibacterium halotolerans*	LMG 21660(T)	AJ620368	98.642	20/1473
7	*Bacillus atrophaeus*	JCM 9070(T)	AB021181	98.642	20/1473
8	*Bacillus subtilis subsp. subtilis*	NCIB 3610(T)	ABQL01000001	98.58	21/1479
9	*Bacillus vallismortis*	DSM 11031(T)	AB021198	98.513	22/1479
10	*Bacillus amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens*	DSM 7(T)	FN597644	98.377	24/1479
11	*Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum*	FZB42(T)	CP000560	98.242	26/1479
12	*Bacillus siamensis*	PD-A10(T)	GQ281299	98.174	27/1479
13	*Bacillus methylotrophicus*	CBMB205(T)	EU194897	98.125	27/1440
14	*Bacillus altitudinis*	41KF2b(T)	AJ831842	96.685	49/1478
15	*Bacillus stratosphericus*	41KF2a(T)	AJ831841	96.685	49/1478

[0037] **실시예 2: 바실러스 CS32가 생산하는 항균 및 항염 펩타이드 정제**

[0038] 바실러스 속 CS32로부터의 항미생물 펩타이드(CSP32) 생산 배지는 다양한 탄소원 및 질소원을 사용함으로써 최적화되었다. 글루코오스 및 펩톤 및 비프 추출물이 유효 펩타이드 최대 생산을 위한 최적의 탄소원 및 질소원으로 밝혀졌다. 마지막으로, CSP32의 생산은 GPB 배지(1% 글루코오스, 0.5% 펩톤 및 0.5% 비프 추출물)에서 수행하였으며, 펩타이드의 생산은 배양 후 12 시간부터 이루어졌고, 60 시간에 최대 생산에 도달하였다. CSP32의 생산 최적 조건인 *Bacillus* sp. CS32를 GPB 배지에서 37 ℃에서 60 시간 동안 배양하였다. 세포들을 원심분리(6000 rpm, 30 분, 4 ℃)에 의해 제거하고, 상층액 중에 포함된 펩타이드를 60% 포화도의 황산 암모늄으로 4 ℃에서 밤새 침전시켰다. 침전물을 원심분리(6,000 rpm, 60 분, 4 ℃)에 의해 모으고, 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 현탁 후 1 kDa 컷-오프 멤브레인(Millipore)을 사용하여 농축, 투석시켰다. CSP32는 황산 암모늄 침전에 이에 Sepharose CL-6B와 Sephadex G50 상의 연속적인 크로마토그래피에 의해 정제하였다(도 2 참조). 도 2는 바실러스 속 CS32의 배양액에 황산암모늄 처리 후 얻은 조추출물의 컬럼 크로마토그래피 용출 프로필을 나타내는 그라프도이다. ((a) Sepharose CL-6B 컬럼(2.2 cm x 116 cm) 상에서 겔 투과 크로마토그래피. 단백질은 5 ml/min.의 유속으로 용출함. (b) Sephadex G-50 컬럼(1.5 cm x 70cm) 상의 겔 투과 크로마토그래피. 단백질은 1 ml/min.의 유속으로 용출함.)

[0039] **실시예 3: 유효 펩타이드의 분자량 및 N-말단 아미노산 서열 분석**

[0040] 정제된 펩타이드의 분자량은 tricine SDS-PAGE을 통해 확인하였다. 억제 활성의 *in situ* 검출을 위하여 겔을 2.5% Triton X-100을 함유한 50mM Tris-HCl 완충액(pH 7.9)으로 세척하고 지시 균주(10^6 콜로니 형성 단위)를 함유한 연질 아가 상에 중첩시켜 37 ℃에서 배양 하였다. 펩타이드의 분자량은 MALDI-TOF-MASS에 의해 확인하였다. N-말단 아미노산 서열화는 자동화 Edman 분해법에 따른 procise 492 amino sequencer(Applied Biosystems,

Foster City, CA)으로 수행하였다.

[0041] 정제된 펩타이드는 Tricine SDS-PAGE 및 *in situ* 억제 활성을 통하여 확인하였다(도 3a 참조). MALDI-TOF MASS 분석을 통해 CSP32는 5,697.9 Da의 분자량임을 확인하였다(도 3b 참조). 도 3은 분자량을 확인한 전기영동 사진 및 MALDI-TOF 피크를 나타내는 그라프도로서, 트리신 SDS-PAGE 및 CSP32의 활성 밴드의 염색 결과임. (a) Tricine SDS-PAGE: Lane 1, 좌측에 kDa으로 나타낸 대응 값을 갖는 단백질 사이즈 마커; Lane 2, 정제된 CSP32; Lane 3, 단백질밴드의 항균활성 확인 (b) MALDI-TOF-MASS.

[0042] CSP32의 N-말단의 처음의 12개의 아미노산 잔기는 APLEIXXIFHDN는 인 것으로 결정되었다. 이 서열을 관련 항미생물성 펩타이드와 비교하고 표 2에 나타내었다.

표 2

[0043]

항미생물 펩타이드	N-말단 아미노산 서열	상동성(%)	비고
본 발명 펩타이드	A P L E I X X I F H D N	100	서열 1
바실러스 리케니포르미스 26L-10/3RA	I S L E I C X I F H D N	75	서열 2
바실러스 섭틸리스 섭펩틴 JM4-A	X X K E I X W I F H D N	58.33	서열 3
바실러스 섭틸리스 섭펩틴 JM4-B	X X K E I X H I F H D N	58.33	서열 4

[0044] **실시예 4: CSP32의 병원성 미생물에 대한 최소 억제 농도**

[0045] MIC(최소 억제 농도) 값은 Muller Hinton Broth를 사용하여 결정하였다[참조문헌: 17-18]. 메티실린-내성 황색포도상구균(MRSA), 반코마이신-내성 황색포도상구균(VRSA), 반코마이신-내성 엔테로코코시(VRE) 등 병원성 균주에 각 농도별로 펩타이드를 처리 후 18시간 후에 병원성 미생물의 생육을 관찰하였다. 대조군으로는 항생제인 바시트라신 및 반코마이신을 사용하였다.

[0046] 표 3에 나타낸 바와 같이, CSP32는 그람 양성 세균에 대하여 좋은 항균활성을 보였고, 그람 음성 세균에 대해서는 활성을 나타내지 않았으나 대조군인 바시트라신과 반코마이신과 비교하였을 때 CSP32가 특히 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), MRSA, VRSA 및 VRE에 대하여 강한 항균활성을 보임을 확인하였다.

표 3

[0047]

시험 미생물	MIC		
	CSP32	Bacitracin	Vancomycin
Alcaligenes faecalis ATCC 1004	>80	>80	>80
Salmonella typhimurium KCTC 1925	>80	>80	>80
Escherichia coli KCTC 1923	>80	>80	>80
Pseudomonas aeruginosa KCTC 1637	>80	>80	>80
Micrococcus luteus ATCC 9341	0.156	>80	0.156
Mycobacterium smegmatis ATCC 9341	>80	>80	0.3125
Enterococcus faecalis ATCC 29212	5	5	2.5
Bacillus subtilis ATCC 6633	>80	40	>80
Listeria monocytogenes KCTC 3569	10	0.3125	0.156
Staphylococcus aureus KCTC 1928	5	40	0.3125
MRSA 639E	2.5	40	0.3125
MRSA 4-5	5	1.25	0.3125
MRSA 5-3	2.5	1.25	0.3125
MRSA U4	40	1.25	0.3125
MRSA S3	10	1.25	0.3125
MRSA P3	40	1.25	0.625
MSRA S1	40	1.25	0.625

VRSA	40	>80	>80
VRE 2	10	0.3125	>80
VRE 3	>80	20	>80
VRE 4	10	5	>80
VRE 5	10	1.25	>80
VRE 6	>80	>80	>80
VRE 82	80	40	>80
VRE 89	>80	40	>80

[0048]

[0049] **실시예 5: 바실러스 CS32가 생산하는 항균 펩타이드의 안정성**

[0050] 열 안정성에 대한 CSP32 활성은 잔여 활성들을 측정함으로써 평가하였다. 각 온도별로 열 처리 후(30 ~ 121 ℃, 10~60분), 시료들을 지시 균주인 *Micrococcus luteus* ATCC9341에 대해 잔여 항미생물 활성을 시험하였다.

[0051] 항미생물 활성에 대한 pH의 안정성은 pH 수준을 변화시킴으로써 측정하였다. 먼저 시료들을 시트레이트 및 Na_2HPO_4 (pH3.0-7.0), Tris(pH7.0-9.0), $NaHCO_3$, NaOH(pH 10.0-11.0) 완충액을 사용하여 pH를 조정하였다. pH를 조정한 시료들을 펩타이드와 혼합 후 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 시료들을 다시 pH 7.0으로 조정하고, 항미생물 활성을 시험하였다.

[0052] 다음은 단백질 분해효소에 대한 안정성을 확인하기 위하여 항미생물성 펩타이드에 각 단백질 분해 효소가 최종 농도 1mg/ml가 되도록 처리하였다; 리파아제 (50 mM Tris-HCl, pH7.5), 프로테아제 K (50 mM Tris-HCl, pH7.5), α-키모트립신 (50 mM Tris-HCl, pH7.5), 트립신 (50 mM Tris-HCl, pH8.0)을 사용하였으며 각 효소들과 펩타이드 반응액을 실온에서 1 시간 동안 반응시킨 후, 효소들을 2 분 동안 100 ℃에서 끓여서 불활성화시켰다. 또한 화학물질에 대한 안정성을 확인하기 위하여 각각의 화학물질(시험 농도는 표 7에 나타냄)에 CSP32에 가하고 시료들을 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, 시험 미생물들에 대한 잔류 항미생물 활성을 시험하였다.

[0053] 시험 결과를 표 4 및 5에 각각 나타내었다. 이 결과로부터 CSP32는 30℃ 이상, 90 ℃ 이하 및 pH 5.0-12.0에서 활성이 거의 감소되지 않고 안정함을 확인하였다. 하지만 121 ℃ 이상에서는 활성이 급격히 감소하였다. 페이퍼 디스크 확산법으로 확인한 단백질 가수분해효소에 대한 안정성 효과에서는 CSP32 펩타이드가 리파아제, 프로테이나제 K, α-키모트립신 및 트립신에 대해 안정하였다(표 6 참조).

[0054] 또한 CSP32는 다양한 화학물질 및 유기 용매에 대해서 안정하였다 (표 7 참조).

표 4

[0055]

온도	시간	잔여 활성 (%)
None		100
30℃	10 분	100
	30 분	100
	60분	100
50℃	10 분	100
	30 분	98
	60분	98
70℃	10분	98
	30분	98
	60분	98
90℃	10분	98
	30분	95.9
	60분	95.9
121℃	105 kPa/15분	65.3

표 5

[0056]

pH	잔여 활성(%)
None	100

pH 2	61.5
pH 3	63
pH 4	89.8
pH 5	95.9
pH 6	100
pH 7	100
pH 8	100
pH 9	100
pH 10	98
pH 11	91.8
pH 12	91.8

[0057] *표 6*

단백질분해 효소	잔여 활성 (%)
None	100
Lipase	98.3
Proteinase K	95.7
α-chymotrypsin	94.3
trypsin	100

[0058] *표 7*

처리	농도	잔여 활성(%)
None		100
Acetone	10% (v/v)	103.6
Chloroform	10% (v/v)	103.8
Ethanol	10% (v/v)	105.9
Methanol	10% (v/v)	101.56
Ethyl acetate	10% (v/v)	101.8
EDTA	10 mM/ml	101.8
Trichloroacetic acid	100 mg/ml	101.3
Triton X-100	1% (v/v)	91.6
Tween 20	10% (v/v)	109.6
Tween 80	10% (v/v)	108.3

[0059] **실시예 6: 세포 배양 및 세포 생존율 측정**

[0060] 쥐의 대식구 세포주인 Raw264.7은 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지를 사용하였고, 5% CO_2, 37℃에서 배양하였다. 항균 펩타이드의 세포에 대한 독성은 MTT 방법[참조문헌: 19]으로 확인하였다. 세포(10^6 cells/ml)를 96 웰 플레이트에 분주하고 항균펩타이드를 농도별(10, 50, 100 μg/ml)로 24시간 처리하였다. Well당 20μl의 MTT 용액을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 3시간 반응시킨 후, ELISA 판독기를 이용하여 540nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4는 CSP32의 세포 생존능에 미치는 영향을 나타내는 그라프도이다. 도 4로부터 확인되는 바와 같이, CSP32는 5-100 μg/ml의 범위에서 Raw 264.7 세포에 대하여 세포독성을 나타내지 않았다. 이에 CSP32의 ELISA, western blot, RT-PCR의 실험에서 100 μg/ml 이하의 농도를 사용하여 실험을 진행하였다.

[0061] **실시예 7: 일산화질소 생성량과 세포내 염증관련 단백질 발현 양상 측정**

[0062] 일산화질소(NO)의 농도는 배양액 내의 질산염(nitrate) 농도를 Griess 시약을 이용하여 측정하였다[참조문헌: 19]. Raw 264.7 세포들(10^6cells/ml)을 6 웰 플레이트 상에 접종시키고, 세포에 1 μg/ml의 LPS를 처리하고 1시

간 뒤에 10, 50, 100 μg/ml의 펩타이드를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액의 상층액은 동일양의 Griess 시약(5% 인산 및 0.1 % 나프틸에틸렌디아민디하이드로클로라이드 중의 1% 술파닐아마이드)과 혼합하고 실온에서 10 분 동안 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 일산화질소(NO) 생성율을 확인하였다.

[0063] 일산화질소(NO)생성에 대한 CSP32의 효과를 확인하기 위해 생성된 일산화질소의 양을 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 그 결과 Raw 264.7 세포에 LPS를 처리한 후 CSP32를 처리한 일산화질소의 생성량의 변화는 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타낸 바와 같이, LPS 처리한 경우 미처리 세포에 비하여 일산화질소의 생성이 상당히 증가되었고, CSP32를 농도별(10, 50, 100 μg/ml)로 처리한 세포들에서는 일산화 질소의 생성량이 상당히 저해됨을 확인할 수 있었다.

[0064] 일산화 질소의 생성율을 확인 후 염증과 관련된 iNOS, COX-2 단백질의 양을 측정하여 CSP32의 염증 효과를 측정하였다. 대식세포주(Raw264.7)를 배양한 뒤 세포에 1μg/ml의 LPS를 처리하고 1시간 뒤에 CSP32를 농도별(10, 50, 100 μg/ml)로 처리하여 24시간 배양 후 배지를 제거하고 인산완충식염수(phosphate buffer saline, PBS)로 세척한 후 lysis 버퍼를 이용하여 단백질을 추출하였다. 이 단백질을 bradford assay로 농도를 정량 한 후 10% SDS-PAGE로 분리하고 PVDF 막으로 이동시켰다. 이 막을 iNOS, COX-2에 대한 1, 2차 항체로 반응시킨 후 염증 단백질의 발현 양상을 확인하였다.

[0065] 도 5에 나타낸 바와 같이, CSP32를 처리하였을 때 LPS에 의해 증가된 iNOS와 COX-2의 단백질의 발현량이 농도 의존적으로 유의성 있게 감소되었다.

[0066] **실시예 8: 사이토카인 생성량 측정**

[0067] 세포배양액 내의 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 생성량에 영향을 미치는 CSP32의 억제 효과는 ELISA에 의해 결정하였다. Raw 264.7 세포들(10^6cells/ml)을 6 웰 플레이트 상에 접종시키고, 세포에 1 μg/ml의 LPS를 처리하고 1시간 뒤에 10, 50, 100 μg/ml의 펩타이드를 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 배양배지를 취하여 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 생성량을 분석하였다. 그 결과를 도 6에 나타냈다. 도 6은 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 대식구 세포에서 TNF-α, IL-1β, IL-6 생산 억제에 미치는 CSP32의 효과를 나타내는 그라프도이다. 대식세포는 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 등의 염증 매개 물질을 분비하여 초기 염증 반응에 중요한 역할을 한다. LPS는 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 생산을 상당히 증가시켰다. 도 6에 나타낸 바와 같이, LPS에 의해 유도된 사이토카인 방출은 CSP32에 의하여 농도 의존적으로 상당히 억제되었다. 이들 결과는 CSP32가 대식세포에서 TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 염증과 관련된 사이토카인의 생성을 억제하였음을 나타내는데, 이는 CSP32가 항염증성 작용에 관여하는 것으로 판단된다.

[0068] **실시예 9: RT-PCR를 통한 세포내 염증 관련 mRNA 발현 분석**

[0069] CSP32의 항염증 효과를 확인하기 위하여 RT-PCR 방법을 이용하여 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-Iβ, IL-6의 mRNA 발현 양상 분석하였다. 대식세포를 이용하여 배양한 후 CSP32를 처리한 다음 24시간 후에 인산완충식염수(PBS)로 세척한 후 Trizol을 이용하여 RNA를 분리하였다. RNA 1 μg과 PCR 프라이머와 혼합 후 RT-PCR를 수행하였다. 프라이머 서열들을 표 8에 열거하였다.

표 8

[0070]

프라이머	프라이머 서열	
	Forward	Reverse
iNOS	5`-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3`(5)	5`-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3`(6)
COX-2	5`-CACTACATCCTGACCCACTT-3`(7)	5`-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3`(8)
TNF-α	5`-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3`(9)	5`-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3`(10)
IL-1β	5`-TGGACGGACCCCAAAAGATG-3`(11)	5`-AGAAGGTGCTCATGTCCTCA-3`(12)
IL-6	5`-GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3`(13)	5`-TGTACTCCAGGTAGCTATGG-3`(14)
GAPDH	5`-CACTCACGGCAAATTCAACGGCAC-3`(15)	5`-GACTCCACGACATACTCAGCAC-3`(16)

[0071] RT-PCR의 조건은 42 ℃에서 1시간 반응하여 cDNA를 제조하고 94 ℃에서 5분간 반응하여 역전사 효소를 불활성화시켰다. 그 후, 94 ℃에서 30초간 변성(denaturation), 58 ℃에서 30 초간 어닐링(annealing) 및 72 ℃에서 40초간 프라이머 연장(extention)을 30회 반복하여 수행하였다. PCR 생성물들을 1% 아가로오스 겔 상에서 분리하고, 밴드들을 브롬화 에티듐 염색에 의해 가시화하였다.

[0072] CSP32가 일산화질소 생성에 미치는 영향을 iNOS 및 COX-2의 유전자 수준에서 관련되는지를 알아보기 위하여, iNOS, COX-2 및 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA의 발현을 RT-PCR로 측정하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7은 LPS에 의해 활성화된 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA 유전자 발현에 미치는 CSP32의 효과를 나타내는 전기영동 사진이다. GAPDH를 RT-PCR의 대조군으로 사용하였다.

[0073] CSP32와 함께 LPS를 처리한 세포들은 iNOS 및 COX-2 mRNA 발현을 농도 의존적 방식으로 상당히 억제하였다. 또한, TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA 등의 몇가지 전염증성 사이토카인류의 발현을 조사하였는데, LPS를 처리하였을 때 TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA 레벨이 증가하였으며, CSP32을 사용한 세포에서는 이런 사이토카인의 발현이 농도 의존적 방식으로 감소하였다(도 7 참조).

[0074] **실시예 10: 제약학적 제제**

[0075] **정제의 제조**

[0076] 실시예 2의 펩티드(CSP32) 50 mg

[0077] 락토오스 80 mg

[0078] 전분 17 mg

[0079] 스테아르산 마그네슘 3 mg

[0080] 결정성 셀룰로오스 10 mg

[0081] 본 발명의 한 실시 형태는 그 예를 상기에 나타낸 정제의 유효 성분으로써 상기 펩티드의 용도이다. 정제는 통상의 방법에 의해 제조될 수 있으며, 한 바람직한 실시형태는 통상의 장용성 피복(예를 들면, 히드록시프로필메틸 셀룰로오스 프탈레이트), 당코팅 또는 피막 코팅을 갖는 정제 또는 연질캅셀 형태이다.

[0082] 이상의 실험 결과를 기초로, 형태학적, 생화학적 및 16S rRNA 유전자 서열 분석 결과, 상기 균주는 바실러스 속 균주(CS32)인 것으로 동정되었다. 이 균주는 표 1에 나타낸 바와 같이 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*)의 것과 가장 높은 16S rRNA 상동성(99.392%)을 나타내었다. 최적 배지 중에서 이 균주에 의해 생산된 항미생물성 펩타이드(CSP32로 명명함)를 균질하게 정제하였으며, 5697.9 Da의 분자량을 확인하였다. CSP32의 N-말단의 처음 12 아미노산 잔기는 A-P-L-E-I-X-X-I-F-H-D-N이었다. NCBI Blast 검색을 통하여 확인한 결과 CSP32의 서열은 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*)로 부터의 생산된 박테리오신-유사 화합물(리케닌)과 가장 높은 상동성을 나타냈다[참조문헌: 20]. 뿐만 아니라, 이 서열은 또한 공유 서열 EIxxIFHDN(여기서, x 미확인 서열임)을 갖는 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*) JM4이 생산하는 항균 펩타이드들과 상당한 동일성을 나타냈다[참조문헌: 8]. 이러한 결과들을 분석한 결과 N-말단 아미노산 서열과 분자량을 통하여 비교하였을 때 CSP32는 신규 타입의 항미생물성 펩타이드이다. CSP32는 90℃C 이하 및 pH 5.0-12.0에서 안정성을 보이며, CSP32의 pH 및 온도 안정성은 리케닌(Lichenin) 및 바실러스 섭틸리스 균주 JM4로 부터의 항균 펩타이드들과 필적할만 하였다[참조문헌: 8, 20]. CSP32는 시험한 모든 단백질 분해효소에 대하여 안정하였는데[참조문헌: 18, 20], 단백질 분해 효소 농도가 항미생물성 활성을 불활성화하는데 필요하였으나, 바실러스 종(*Bacillus* spp.)에 의해 생산되는 일부 항미생물제는 흔치 않은 아미노산을 포함하는 환형의 펩타이드들로서 이들은 가수분해성 효소에 더욱 내성을 갖는다. CSP32의 항균활성 효능은 다양한 그람 양성 및 그람 음성 세균에 대해 평가하였다. CSP32는 그람 양성 미생물에 대하여 효과적인 항미생물 활성을 나타내었는데, 이는 바실러스 종(*Bacillu* ssp. JM4[참고문헌: 8] 및 바실러스 리케니포르미스 A89의 항미생물성 펩타이드의 효능과 필적할만 하였다[참조문헌: 21]. 더욱이 MRSA, VRSA 및 VRE 등의 다약제내성 세균에 대한 CSP32의 항미생물 활성은 바시트라신 및 반코마이신과 비교하여 더 좋은 효과를 보였으나, 이는 BCP61 보다는 약한 항균효과를 보

였다[참조문헌: 18].

[0083] 또한, 본 발명자들은 또한 CSP32가 LPS에 의해 활성된 Raw 264.7 세포에서 전염증성 매개자인 일산화질소(NO), iNOS 및 COX-2 단백질의 생성을 상당히 억제하였음을 밝혀내었다. 이러한 결과들은 CSP32의 억제 효과가 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현 억제에 의해 유발됨을 의미하며, RT-PCR 분석은 iNOS 및 COX-2의 mRNA 수준에서 이들의 단백질 레벨과 상관됨을 나타냈다.

[0084] 따라서, iNOS 및 COX-2 유전자 발현 상에서 CSP32의 억제 효과는 유효 펩타이드의 항염증성 작용에 관여하는 메카니즘의 하나인 것으로 보인다. CSP32는 염증에 수반된 유전자 발현을 억제하는 것을 확인하고 본 발명자들은 TNF-α, IL-1β 및 IL-6에서 전염증성 사이토카인 생성을 평가하였다. 이들 사이토카인류는 주로 활성화된 대식구에 의해 생산된다. 사이토카인 생산의 억압은 염증성 과정을 헤아리는데 중요한 메카니즘이다[참조문헌: 13-15]. 항균펩타이드들은 전염증성 매개자를 억제하는 것으로 밝혀졌으므로, 본 발명자들은 LPS에 의해 유도된 사이토카인 방출에 미치는 이들의 효능에 관하여 ELISA 및 RT-PCR에 의해 더 조사하였다. LPS (1μg/mL) 와 CSP32를 처리하여 24시간 동안 배양시킨 다음에 Raw 264.7 세포에서 사이토카인 생산(도 6) 및 mRNA 발현 (도 7)에서 확인한 바와 같이 현저한 억제가 있었다.

[0085] 이러한 결과들은 CSP32가 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7에서 iNOS 및 COX-2 유전자 및 단백질 발현, 사이토카인 생산의 강력한 억제제임을 의미하며, 이는 이전의 보고들과 일치된다[참조문헌: 13-15].

[0086] 결론적으로, CSP32는 한국의 전통 음식으로부터 분리된 바실러스 균주로부터 정제된 강력한 항미생물 및 항염증성 활성을 갖는 펩타이드이다. 이들 결과는 CSP32가 다약제내성 병원균의 치료 뿐만 아니라 염증관련 질환의 치료에 있어서 치료제로서 사용될 수 있는 이기능성 펩타이로서 개발될 수 있는 적합한 후보자가 될 수 있음을 나타낸다.

[0087] [참조문헌]

[0088] [1] Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM, Fujimoto D, Mazzola M, Bangera G, et al. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:4197-201.

[0089] [2] Rana M, Chatterjee S, Kochhar S, Pereira B. Antimicrobial peptides: a new dawn for regulating fertility and reproductive tract infections. J Endocrinol Reprod. 2006;2:88-95.

[0090] [3] Bizani D, Brandelli A. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated Bacillus sp. Strain 8 A. J Appl Microbiol. 2002;93:512-9.

[0091] [4] Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D, Cherif H, Ben Slama K, Hassen A, et al. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by Bacillus thuringiensis BMG1.7, a new strain isolated from soil. Lett Appl Microbiol. 2001;32:243-7.

[0092] [5] Ahern M, Verschueren S, van Sinderen D. Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by Bacillus thuringiensis strain B439. FEMS Microbiol Lett. 2003;220:127-31.

[0093] [6] Dischinger J, Josten M, Szekat C, Sahl HG, Bierbaum G. Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by Bacillus licheniformis DSM 13. PLoS One. 2009;4:e6788.

[0094] [7] Oscariz JC, Lasa I, Pisabarro AG. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by Bacillus cereus with a broad spectrum of activity. FEMS Microbiol Lett. 1999;178:337-41.

[0095] [8] Wu S, Jia S, Sun D, Chen M, Chen X, Zhong J, et al. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides Subpeptin JM4-A and Subpeptin JM4-B produced by Bacillus subtilis JM4. Curr Microbiol. 2005;51:292-6.

[0096] [9] Lee HJ, Joo YJ, Park CS, Kim SH, Hwang IK, Ahn JS, et al. Purification and characterization of a bacteriocin produced by Lactococcus lactis subsp. lactis H-559 isolated from kimchi. J Biosci Bioeng. 1999;88:153-9.

[0097] [10] Kayalvizhi N, Gunasekaran P. Production and characterization of a low-molecular-weight bacteriocin from Bacillus licheniformis MKU3. Lett Appl Microbiol. 2008;47:600-7.

[0098] [11] Khalil R, Elbahloul Y, Djadouni F, Omar S. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated Bacillus megaterium 19 strain. Pak J Nutr. 2009;8:242-50.

[0099] [12] Rosenfeld Y, Shai Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2006;1758:1513-22.

[0100] [13] Sarkar D, Saha P, Gamre S, Bhattacharjee S, Hariharan C, Ganguly S, et al. Anti-inflammatory effect of allylpyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via the NF-kappaB pathway. Int Immunopharmacol. 2008;8:1264-71.

[0101] [14] Yoon WJ, Heo SJ, Han SC, Lee HJ, Kang GJ, Kang HK, et al. Anti-inflammatory effect of sargachromanol G isolated from Sargassum siliquastrum in RAW 264.7 cells. Arch Pharm Res. 2012;35:1421-30.

[0102] [15] Yu HY, Kim KS, Lee YC, Moon HI, Lee JH. Oleifolioside A, a New Active Compound, Attenuates LPS-Stimulated iNOS and COX-2 Expression through the Downregulation of NF-kappaB and MAPK Activities in RAW 264.7 Macrophages. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:637512.

[0103] [16] Yoon WJ, Kim SS, Oh TH, Lee NH, Hyun CG. Cryptomeria japonica essential oil inhibits the growth of drug-resistant skin pathogens and LPS-induced nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production. Pol J Microbiol. 2009;58:61-8.

[0104] [17] Cho SS, Choi YH, Simkhada JR, Mander P, Park da J, Yoo JC. A newly isolated Streptomyces sp. CS392 producing three antimicrobial compounds. Bioprocess Biosyst Eng. 2012;35:247-54.

[0105] [18] Choi YH, Cho SS, Simkhada JR, Yoo JC. A novel thermotolerant and acidotolerant peptide produced by a Bacillus strain newly isolated from a fermented food (kimchi) shows activity against multidrug-resistant bacteria. Int J Antimicrob Agents. 2012;40:80-3.

[0106] [19] Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. Biochem Pharmacol. 1999;58:759-65.

[0107] [20] Pattnaik P, Kaushik JK, Grover S, Batish VK. Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (Lichenin) produced anaerobically by Bacillus licheniformis isolated from water buffalo. J Appl Microbiol. 2001;91:636-45.

[0108] [21] Mendo S, Faustino NA, Sarmento AC, Amado F, Moir AJ. Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermotolerant Bacillus licheniformis strain. Biotechnol Lett. 2004;26:115-9.

수탁번호

[0109]

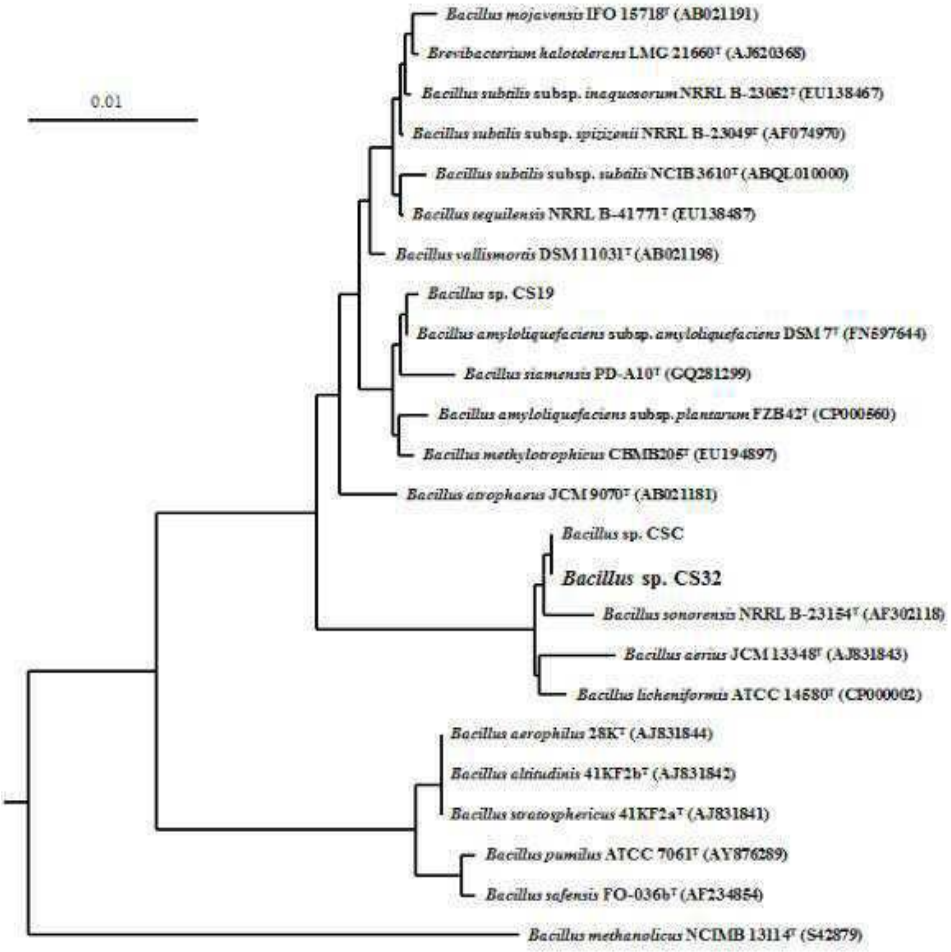
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18250P

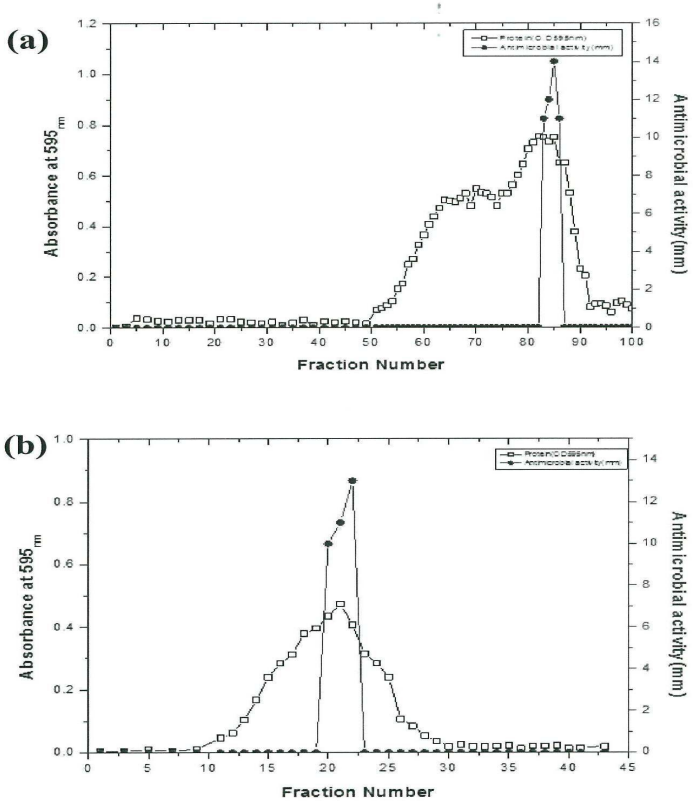
수탁일자 : 20130717

도면

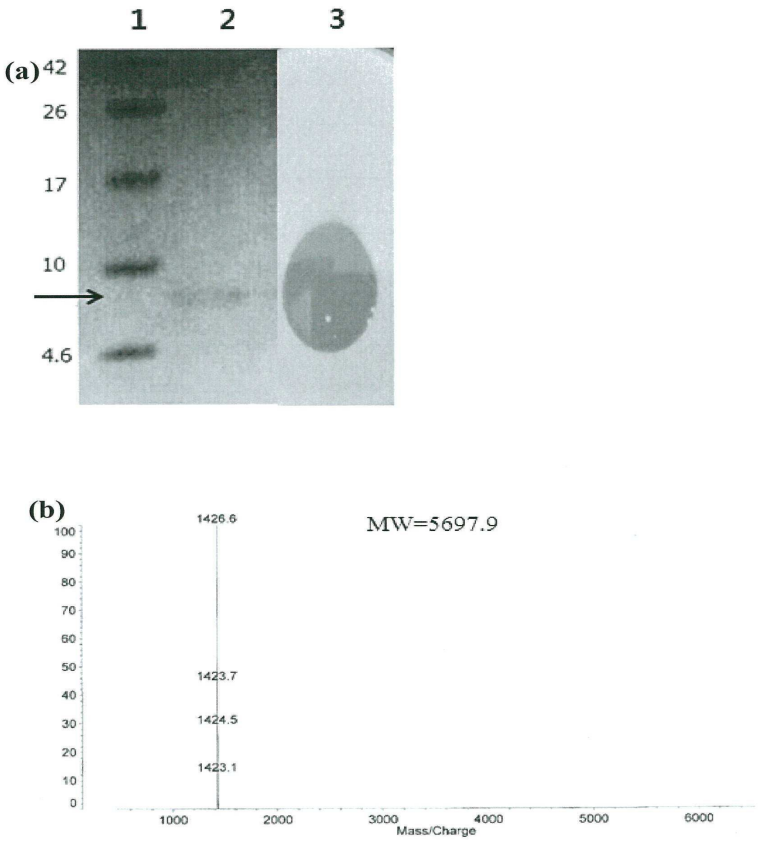
도면1


0.01
Bacillus mojavensis IFO 15718T (AB021191)
Brevibacterium halotolerans LMG 21660T (AJ620368)
Bacillus subtilis subsp. inaquosorum NRRL B-23052T (EU138467)
Bacillus subtilis subsp. spizizenii NRRL B-23049T (AF074970)
Bacillus subtilis subsp. subtilis NCIB 3610T (ABQL010000)
Bacillus tequilensis NRRL B-41771T (EU138487)
Bacillus vallismortis DSM 11031T (AB021198)
Bacillus sp. CS19
Bacillus amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens DSM 7T (FN597644)
Bacillus siamensis PD-A10T (GQ281299)
Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum FZB42T (CP000560)
Bacillus methylotrophicus CBMB205T (EU194897)
Bacillus atrophaeus JCM 9070T (AB021181)
Bacillus sp. CSC
Bacillus sp. CS32
Bacillus sonorensis NRRL B-23154T (AF302118)
Bacillus aerius JCM 13348T (AJ831843)
Bacillus licheniformis ATCC 14580T (CP000002)
Bacillus aerophilus 28KT (AJ831844)
Bacillus altitudinis 41KF2bT (AJ831842)
Bacillus stratosphericus 41KF2aT (AJ831841)
Bacillus pumilus ATCC 7061T (AY876289)
Bacillus safensis FO-036bT (AF234854)
Bacillus methanolicus NCIMB 13114T (S42879)

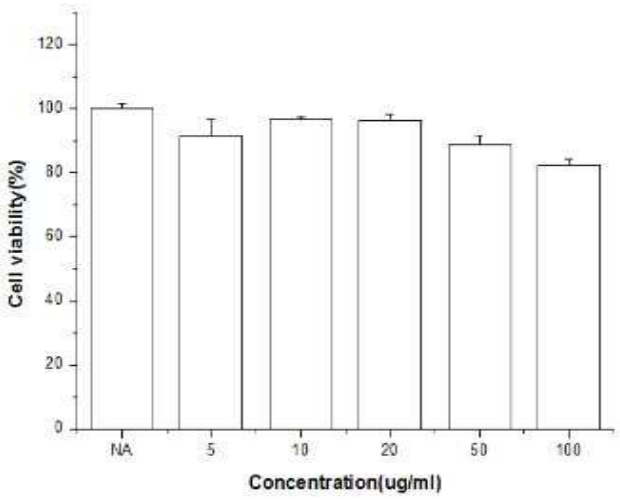
도면2


(a)
Absorbance at 595 nm
Antimicrobial activity (mm)
Fraction Number
(b)
Absorbance at 595 nm
Antimicrobial activity (mm)
Fraction Number

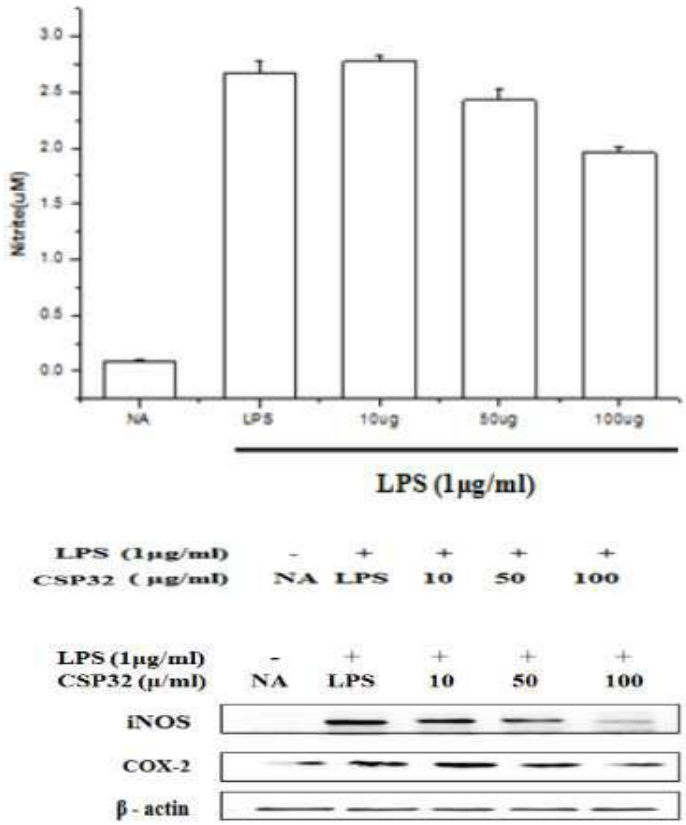
도면3


1
2
3
(a)
42
26
17
10
4.6
(b)
MW=5697.9
1426.6
1423.7
1424.5
1423.1
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
Mass/Charge

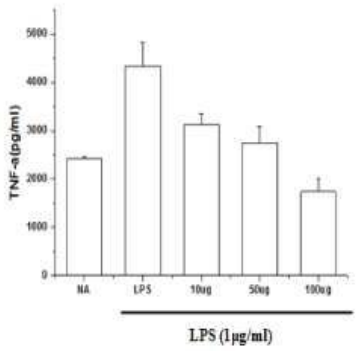
도면4

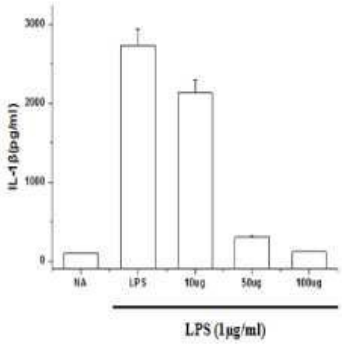

120
100
80
60
40
20
0
Cell viability(%)
NA
5
10
20
50
100
Concentration(ug/ml)

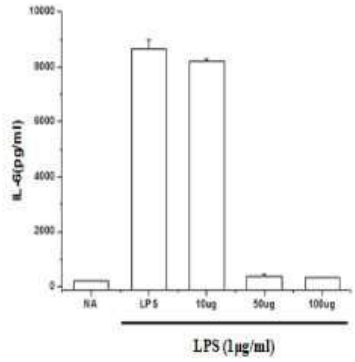
도면5


Nitrite(uM)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NA
LPS
10ug
50ug
100ug
LPS (1μg/ml)
LPS (1μg/ml) - + + + +
CSP32 (μg/ml) NA LPS 10 50 100
LPS (1μg/ml) - + + + +
CSP32 (μ/ml) NA LPS 10 50 100
iNOS
COX-2
β - actin

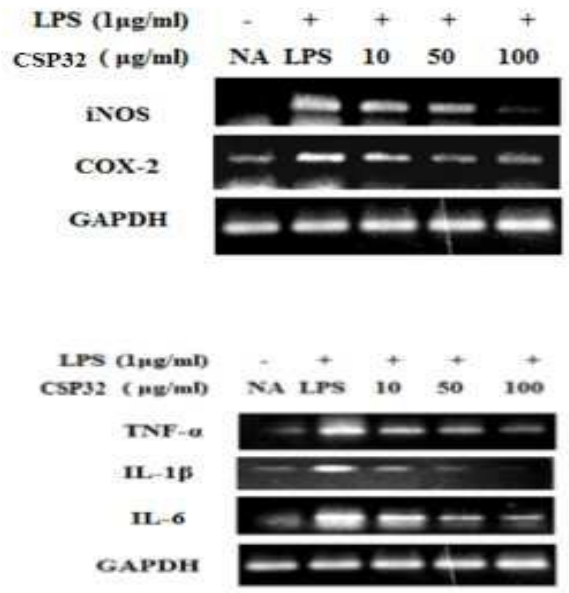
도면6


TNF-α(pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
NA
LPS
10ug
50ug
100ug
LPS (1μg/ml)


IL-1β(pg/ml)
3000
2000
1000
0
NA
LPS
10ug
50ug
100ug
LPS (1μg/ml)


IL-6(pg/ml)
10000
8000
6000
4000
2000
0
NA
LPS
10ug
50ug
100ug
LPS (1μg/ml)

도면7



서 열 목 록

<110> Chosun University Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> A novel bifunctional peptide and its use with antimicrobial activity and anti inflammatory action from Bacillus strain

<130> pkr-453

<160> 16

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Streptomyces

<400> 1

Ala Pro Leu Glu Ile Xaa Xaa Ile Phe His Asp Asn
1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Bacillus licheniformis

<400> 2

Ile Ser Leu Glu Ile Cys Xaa Ile Phe His Asp Asn

1 5 10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 3

Xaa Xaa Lys Glu Ile Xaa Trp Ile Phe His Asp Asn

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 4

Xaa Xaa Lys Glu Ile Xaa His Ile Phe His Asp Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 25

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

cccttccgaa gtttctggca gcagc 25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ggctgtcaga gcctcgtggc tttgg 25

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

cactacatcc tgacccactt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

atgctcctgc ttgagtatgt 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

tctcatcagt tctatggccc 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gggagtagac aaggtacaac 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

tggacggacc ccaaaagatg 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

agaaggtgct catgtcctca 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gttctctggg aaatcgtgga 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

tgtactccag gtagctatgg 20

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

cactcacggc aaattcaacg gcac 24

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

gactccacga catactcagc ac 22