



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월22일  
(11) 등록번호 10-2035283  
(24) 등록일자 2019년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/33 (2006.01) A23K 20/147 (2016.01)  
A23K 20/195 (2016.01) A23L 33/18 (2016.01)  
A61K 38/00 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)  
C11D 3/386 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 14/33 (2013.01)  
A23K 20/147 (2016.05)  
(21) 출원번호 10-2019-0013005  
(22) 출원일자 2019년01월31일  
심사청구일자 2019년01월31일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR101785487 B1  
NCBI Genbank Accession No. YP\_007006991.1  
(2018.08.13.)  
US20180195055 A1

(73) 특허권자  
서울대학교 산학협력단  
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)  
(72) 발명자  
유상열  
서울특별시 강남구 도곡동 467-6 43/2 대림아크로  
빌 A동 1001호  
신다운  
서울특별시 관악구 관악로30길 27, 109동 404호  
(관악푸르지오)  
하은수  
서울특별시 관악구 관악로14길 28-3, 201호  
(74) 대리인  
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 문명순

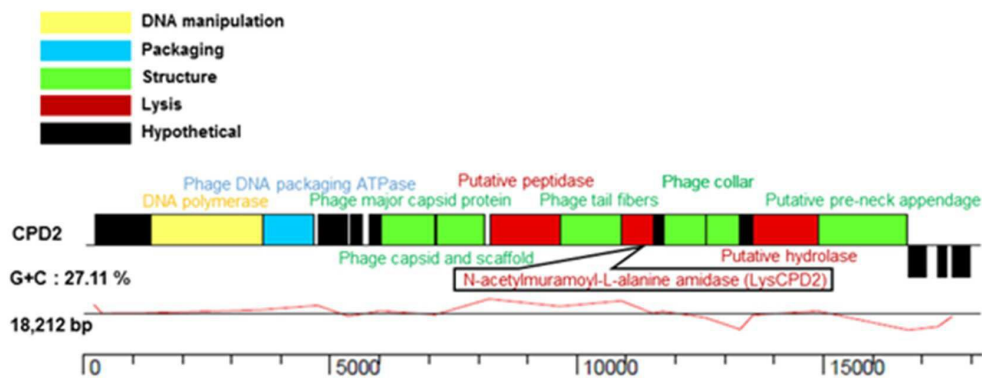
(54) 발명의 명칭 **클로스트리디움 퍼프린젠스 용해능을 가진 내열성 엔도라이신 LysCPD2**

(57) 요약

본 발명은 클로스트리디움 퍼프린젠스 용해능을 가진 내열성 엔도라이신 LysCPD2에 관한 것으로, 본 발명에서 새롭게 분리한 엔도라이신 LysCPD2는 식중독을 일으키는 원인균 중 하나인 클로스트리디움 속 균주들과 바실러스 속 균주들에 대해 특이적인 용균작용을 보이고, 특히 열을 가했을 때도, 안정적인 항균활성을 발휘한다.

따라서, 본 발명의 엔도라이신은 클로스트리디움 퍼프린젠스균의 감염에 의한 질환 치료용으로 사용할 수 있고, 생물학적 방제제로써 클로스트리디움 퍼프린젠스균으로 인한 가축 및 가금류의 발병의 감소에 기여할 수 있으며, 새로운 개념의 항생제 내성균 제어방안 개발을 통해 가축 및 가금류 소비의 안전성을 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- A23K 20/195 (2016.05)
- A23L 33/18 (2016.08)
- A61K 38/00 (2013.01)
- A61P 31/04 (2018.01)
- C11D 3/38636 (2013.01)
- A23V 2002/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

- 과제고유번호 NRF-2017R1A2A1A17069378
- 부처명 과학기술정보통신부
- 연구관리전문기관 한국연구재단
- 연구사업명 중견연구자지원사업
- 연구과제명 농식품 저장성과 안전성 향상을 위한 박테리오파지-숙주 상호작용 연구 및 박테리오파지, 엔도라이신 엔지니어링
- 기여율 7/10
- 주관기관 서울대학교
- 연구기간 2017.09.01 ~ 2020.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

- 과제고유번호 710012-03-1-SB110
- 부처명 농림축산식품부
- 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
- 연구사업명 농림축산식품연구센터지원사업
- 연구과제명 식중독균에 대한 생물학적 제어 기술 현장 적용 및 산업화
- 기여율 3/10
- 주관기관 서울대학교
- 연구기간 2017.09.01 ~ 2020.02.29

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

클로스트리디움 퍼프린젠스 (*Clostridium perfringens*)에 대한 억제활성을 가지는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 엔돌라이신 LysCPD2.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 엔돌라이신은,

바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*) ATCC 13061 또는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) ATCC 23857에 대한 억제활성을 더 가지는 것을 특징으로 하는 엔돌라이신 LysCPD2.

#### 청구항 3

제1항의 엔돌라이신 LysCPD2를 포함하는 식품 조성물.

#### 청구항 4

제1항의 엔돌라이신 LysCPD2를 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스 (*Clostridium perfringens*) 감염에 의한 창상감염, 식중독 또는 장독혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 5

제1항의 엔돌라이신 LysCPD2를 포함하는 사료 조성물.

#### 청구항 6

제1항의 엔돌라이신 LysCPD2를 포함하는 세정제 조성물.

## 발명의 설명

### 기술분야

[0001] 본 발명은 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 용해능을 가진 내열성 엔돌라이신 LysCPD2에 관한 것이다.

### 배경기술

[0003] 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)는 클로스티리듐속의 혐기성 포자 내열성 고온균으로 대표적인 독소형 식중독균이며, 가스괴저균으로도 불리운다. 그람양성간균으로 편재성의 아포를 형성하나, 보통 배지에서는 거의 형성되지 않는다. 편성혐기성균이지만 혐기적요구도는 그다지 엄격하지 않다. 토양, 분변 등에 널리 분포되어 있다. 외상으로 침입하며, 각종 독소를 만들고 조직에 침윤해서 가스괴저를 일으킨다.

[0004] 클로스트리디움 퍼프린젠스가 만들어내는 독소의 종류에 따라서 A-F형으로 나뉘어지는데, 사람에게 창상감염 및 식중독을 일으키는 것은 A형이다. 클로스트리디움 퍼프린젠스는 조리 후, 수 시간 상온에 방치된 요리에서 포자의 발아로 증식되며,  $1 \times 10^6$  CFU/g 이상까지 증식하면 심한 복통과 설사 증상을 동반한 식중독을 일으킬 수 있다. 클로스트리디움 퍼프린젠스는 포자를 형성하기 때문에 열과 낮은 pH에 저항성을 보여, 억제 및 제어가 쉽지 않다.

[0005] 한편, 장독혈증(Enterotoxemia)은 클로스트리디움 퍼프린젠스가 소, 면양, 산양, 돼지 등의 장관 내에서 증식하여 생성된 독소에 의해서 괴사성, 출혈성 병변을 특징으로 하는 급성이며 치명적인 질병이다. 이는 전 세계적으로 발생하고 있으며, 사육형태에 따라 현재에는 항생물질을 첨가함으로써 발생을 줄일 수 있다. 하지만, 발병 후에는 항생제 치료 시, 큰 효과를 기대하기 어려운 문제가 있다.

[0006] 기존 합성항생제의 대부분은 세균의 증식을 억제하는 저해 방식으로 작용하며, 이는 내성균 생성의 원인이 된다. 그동안 세균을 제어하기 위해 더 강한 항생제가 개발되어 왔지만, 세균들은 더 강한 내성 세균으로 진화되었고, 이를 해결하기 위해 기존과 다른 새로운 계열의 항생물질 개발이 필요한 실정이다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허 제10-1200333호(2012.11.06)에는, 내열성 엔돌라이신 LysBPS13, 이를 포함하는 식품 및 사료 조성물에 관하여 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국등록특허 제10-1177358호(2012.08.21)에는, 펩티다아제 활성이 있는 엔돌라이신 LysB4, 이를 포함하는 식품 및 사료 조성물에 관하여 기재되어 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0009] 최근 항생제 사용에 대한 정부 차원의 규제가 전 세계적으로 강화됨에 따라 항생제를 대체할 수 있는 수단에 대한 관심이 증대하고 있다. 또한, 클로스트리디움 퍼프린젠스는 포자를 형성하기 때문에 열과 낮은 pH에 저항성을 보여, 억제 및 제어가 쉽지 않다. 이에, 클로스트리디움 퍼프린젠스에 특이적인 용균활성 및 내열성을 가지는 신규의 엔돌라이신을 발굴하여 제공하고자 한다.

**과제의 해결 수단**

- [0011] 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 엔돌라이신 LysCPD2를 제공한다.
- [0012] 본 발명의 엔돌라이신은 바람직하게 클로스트리디움 속 (*Clostridium* Spp.)균주와 바실러스 속 (*Bacillus* Sp p.)균주에 대한 억제활성을 가지는 것이 좋다.
- [0013] 한편, 본 발명은 아미노산 서열로 구성된 엔돌라이신 LysCPD2을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0014] 한편, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 엔돌라이신 LysCPD2을 포함하는 클로스트리디움 속 (*Clostridium* Spp.)균주와 바실러스 속 (*Bacillus* Spp.)균주 감염질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0015] 한편, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 엔돌라이신 LysCPD2을 포함하는 사료 조성물을 제공한다.
- [0016] 한편, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 엔돌라이신 LysCPD2을 포함하는 세정제 조성물을 제공한다.

**발명의 효과**

[0018] 본 발명에서 새롭게 분리한 엔돌라이신 LysCPD2는 식중독을 일으키는 원인균 중 하나인 클로스트리디움 속 균주들과 바실러스 속 균주들에 대해 특이적인 용균작용을 보이고, 특히 열을 가했을 때, 안정적인 항균활성을 발

휘한다.

[0019] 따라서, 본 발명의 엔도라이신은 클로스트리디움 퍼프린젠스균의 감염에 의한 질환 치료용으로 사용할 수 있고, 생물학적 방제제로써 클로스트리디움 퍼프린젠스균으로 인한 가축 및 가금류의 발병의 감소에 기여할 수 있으며, 새로운 개념의 항생제 내성균 제어방안 개발을 통해 가축 및 가금류 소비의 안전성을 향상시킬 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0021] 도 1은 박테리오파지 CPD2 유전체(genome)의 ORF(open reading frame) 분석 결과이다.
- 도 2는 본 발명 엔도라이신 LysCPD2의 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명 엔도라이신 LysCPD2의 정제도를 확인한 결과이다.
- 도 4는 본 발명 LysCPD2의 농도별(0nM, 50nM, 250nM, 500nM)처리에 따른 클로스트리디움 퍼프린젠스 ATCC 13124와 클로스트리디움 퍼프린젠스 FORC 25의 용해능을 확인한 결과이다.
- 도 5는 본 발명 LysCPD2의 최적 용균활성 조건을 확인한 결과이다 (A: 최적 PH, 최적 NaCl 농도, C: 최적온도).
- 도 6은 본 발명 LysCPD2의 아미다제 활성을 확인한 결과이다.
- 도 7은 본 발명 LysCPD2의 내열성에 기반하여 LysCPD2와 함께 열을 가해 활성화시킨 포자에 대한 용해능을 확인한 결과이다.
- 도 8은 본 발명 LysCPD2의 내열성을 측정한 결과이다 (A: 10분, B: 30분).

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0022] 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 LysCPD2를 제공한다. 이때, 본 발명의 엔도라이신은 바람직하게 클로스트리디움 속 (*Clostridium* Spp.)균주와 바실러스 속 (*Bacillus* Spp.)균주에 대한 억제활성을 가지는 것이 좋다.
- [0023] 엔도라이신은 박테리오파지가 생산하는 효소로, 살균항생제이며 세균의 세포벽을 파괴시키는 물질이다. 엔도라이신은 세균 세포벽 내의 펩티도글리칸의 특정 연결부위를 절단하는 작용기작을 보유하고 있으며, 이러한 특성은 내성 문제를 근본적으로 해결할 수 있어 새로운 계열의 항생물질로서 주목받고 있다. 또한, 박테리오파지와 같이, 높은 숙주 특이성으로 인하여 사람 및 동물의 세포와 유익한 세균에는 영향을 미치지 않으며, 항생제 감수성 세균 및 내성 세균 모두에 작용하고, 박테리오파지와 비교할 때보다 넓은 항균 활성 범위를 제공할 수 있다.
- [0024] 이에 본 발명은 식중독 유발균인 클로스트리디움 퍼프린젠스 용해능을 가진 내열성 엔도라이신 LysCPD2를 발굴하여 제공하고자 하는 것이다. 본 발명에서는 하기 실험을 통해 본 발명에서 새롭게 분리한 엔도라이신 LysCPD2가 식중독을 일으키는 원인균 중 하나인 클로스트리디움 속 균주들과 바실러스 속 균주들에 대해 특이적인 용균 작용을 보이고, 특히 열을 가했을 때도, 안정적인 항균활성을 발휘함을 확인하였다.
- [0025] 특히, 본 발명의 엔도라이신 LysCPD2는 pH 6~10에서 항균활성을 보이고, 특히 95℃의 열을 가했을 때, 80%의 활성을 유지하며 안정적인 항균활성을 보이고, 37℃에서 최적의 활성을 나타낸다. 이렇듯 특이적으로 높은 내열성은 향후 열에 노출이 쉬운 사료첨가제 또는 식품첨가제로 사용될 경우 강한 장점을 가질 수 있다.
- [0026] 한편, 본 발명은 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 LysCPD2을 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 식품 조성물은 바람직하게 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜릿, 빵류, 스낵류, 과자류, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나에 첨가되는 것이 좋으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 엔도라이신 LysCPD2는 바람직하게 식품 첨가제 대비 0.1중량%~20중량% 포함되는 것이 좋다. 0.1중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미비하고, 50중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적이다.
- [0028] 한편, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 LysCPD2을 포함하는 클로스트리디움 속 (*Clostridium* Spp.)균주와 바실러스 속 (*Bacillus* Spp.)균주 감염질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공

한다. 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 엔돌라이신 LysCPD2의 함량은, 사용방법, 복용자의 상태에 따라 바람직하게 조절하는 것이 좋다. 본 발명의 면역증강제에서 사균체의 함량은 면역증강제 대비 0.1중량%~50중량%일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 그러나 그 함량이 0.1중량% 미만일 경우 면역 효과가 미미할 수 있으며, 50중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 상승률이 낮아 비경제적일 수 있다.

[0029] 한편, 본 발명의 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물류가 있으며, 이들은 1종 이상 사용될 수 있다. 또한, 예방 및 치료제가 약제일 경우 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유효제 또는 방부제 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0030] 한편, 본 발명의 약학 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화 하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제 (PLASTERS), 과립제 (GRANULES), 로션제 (LOTIONS), 리니먼트제 (LINIMENTS), 리모나데제 (LEMONADES), 방향수제 (AROMATIC WATERS), 산제 (POWDERS), 시럽제 (SYRUPS), 안연고제 (OPHTHALMIC OINTMENTS), 액제 (LIQUIDS FORMULATIONS), 에어로솔제 (AEROSOLS), 엑스제 (EXTRACTS), 엘릭실제 (ELIXIRS), 연고제 (OINTMENTS), 유동엑스제 (FLUIDEXTRACTS), 유제 (EMULSIONS), 현탁제 (SUSPENSIONS), 전제 (DECOCTIONS), 침제 (INFUSIONS), 점안제 (EYE DROPS), 정제 (TABLETS), 좌제 (SUPPOSITORIES), 주사제 (INJECTIONS), 주정제 (SPIRITS), 카타플라스마제 (CATAPLASMA), 캡슐제 (CAPSULES), 크림제 (CREAMS), 트로키제 (TROCOES), 톱크제 (TINCTURES), 파스타제 (PASTES), 환제 (PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0031] 한편, 본 발명의 약학조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 본 면역증강제는 유효성분을 기준으로 하였을 때 1일 0.1 내지 100mg/kg (체중)으로 1회 이상 투여 가능하다. 그러나 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태에 의해 변화될 수 있다.

[0032] 한편, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 엔돌라이신 LysCPD2을 포함하는 세정제 조성물을 제공한다. 본 발명의 세정제 조성물은 세정제 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 추가로 더 포함할 수 있으며, 예컨대 안정화제, 용해화제 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

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

[0037] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0038] 본 발명의 세정제 조성물이 비누, 계면활성제 함유 클렌징 제형 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 구체적인 예로서, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클렌징 제형은 클렌징 폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비 함유 클렌징 제형은 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 젤이며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 한편, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 엔돌라이신 LysCPD2을 포함하는 사료 조성물을 제공한다. 상기 사료 조성물에 있어서, 조성물 총 중량에 대하여 상기 엔돌라이신 LysCPD2를 0.001 ~ 1.0중량% 함유할 수 있다. 이는 그 함량이 조성물 총 중량에 대해 0.001중량% 미만이면 그 항균 효과를 충분히 발휘할 수 없으며, 1.0중량%를 초과하는 경우에는 제형의 안정성 및 안전성에 문제를 야기하기 때문이다.

[0040] 본 발명의 상기 조성물은 통상의 배합사료에 섞어서 경구투여의 방법으로 급여하며, 계속 투여 또는 과다 투여 시에도 면역저하 등의 내성이나 부작용의 문제가 거의 없다.

[0042] 이하, 본 발명의 구성을 하기 실시예 및 실험예를 통해 구체적으로 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0044] [실시예 1: CPD2의 유전체(genome) 분석]

[0045] 마트에서 구매한 식용 닭 샘플로부터 박테리오파지 CPD2를 분리하였고, 분리된 CPD2의 유전체를 분석하고자 하였다. CPD2의 유전체는 페놀-클로로포름(phenol-chloroform) 추출법으로 추출 및 정제하였다. 정제된 DNA는 'Macrogen'사에 의뢰하여 뉴클레오티드 서열을 분석하였다. 서열 분석은 'Sequencer FLX Titanium'을 이용하여 진행되었고, 각 리드(read)의 어셈블리(assembly)는 'De Novo Assembler v. 2. 6'을 이용하여 수행되었다.

[0046] 또한, 유전체가 갖고 있는 ORF의 위치는 '3.02, GeneMark.hmm, FgenesB'를 이용하여 예측하였다. 또한, 'NCBI'의 'BLASTP'를 통해 각 ORF에서 만들어지는 단백질의 기능을 예측하였다. 예측된 ORF의 기능에 따라 각 ORF에 적절한 이름을 명명(annotation)하였고, 기능이 파악되지 않는 ORF는 모두 가설 단백질(hypothetical protein)이라 명명하였다. ORF의 위치와 기능 등은 모두 'Genomic Workbench 6'을 통해 정리하였다.

[0047] 실험결과, 박테리오파지 CPD2 유전체(genome)는 총 길이 18,212 bp, G+C 함량 27.11%의 염기 서열을 갖는 것으로 나타났다. 또한, ORF 분석 결과, 총 22개의 ORF가 예측되었다 (도 1). 도 1은 박테리오파지 CPD2 유전체(genome)의 ORF(open reading frame) 분석 결과이다.

[0048] 또한, InterProScan 프로그램을 이용하여 해당 단백질의 도메인을 분석한 결과, N-터미널(N-terminal)에 용균 활성(lytic activity)이 있는 아미다제 3 (Amidase 3) 도메인을 가지는 것으로 예측되었다. 이 도메인은 박테리오파지 엔돌라이신(endolysin)이 가지는 전형적인 도메인으로, 이에 따라 해당 유전자에서 발현되는 단백질을 엔돌라이신(endolysin)으로 확정하고, 'LysCPD2'라 명명하였다 (도 2, 표 1). 도 2는 본 발명 엔돌라이신 LysCPD2의 모식도를 나타낸 것이다.

표 1

[0049] 엔돌라이신 LysCPD2 핵산 서열 및 아미노산 서열

핵산 서열	ATGAAAATAGGTATTAGAGACGGACATAGTCCAAATTGTAAGGGTGCTATTGGTTTACGTGATGAACAATCATG TATGAGAGTTTATGTAAAGAGGTTATAGAAATATTAGAAAAACATGGGCATGAGGTAGTTTATTGTGGTAGTG ATGCAAGTACACAAAATGGTGAACTTTCAGAAGGTGTAAGAAAAGCTAATAATTCAAATGTTGATATATTTATT TCATTGCACATGAATAGCTTTAATGGGCAAGCCCAAGGAACAGAGGCACTTGTACAGTTGGAGCAAGAAAATTC TATAAAAGAAAATTGCCTCAAGGTTATGCAAAAACCTTTGCTAGTTTAGGTTTAGTAAATAGGGGTGTAAGAAG TTAATTTATATGAAATGAAGAACGTAAAAGCACCAACATAATTTGAAACTATGTTTTGCGATAACCCCAT GACATTAACGAAGTTTGGTCGCCTACACCATACGAAAAAATGGCTTTACTAATTGCAAAATGCTATTGACCCAAC TATTAAGAAAATGAACCTTATAGAGTTGTTGTTCAATATTTAACAACAAAAAGATGCTGAAAACCTGTCAAC AAGAAATTGCTAAAAGATGGTATTGTTTTGTGGAGGAATGTAATTA
아미노산 서열	MKIGIRDGHSPNCKGAIGLRDEQSCMRVLCKEVI EILEKHGHEVVYCGSDASTQNGELSEGVRKANNSNVDIFI SLHMNSFNGQAQGTEALVTVGARNSIKEIASRLCKNFASLGLVNRGVKEVNL YEMKNVKAPNI IFETMFCDNPH DINEVWSPTPYEKMALLIANAI DPTIKENELYRVVVQYFNKKDAENCQQEIAKRWYCFVEECN

[0051] [실시예 2: 엔돌라이신 LysCPD2의 분리 및 발현·정제]

[0052] PCR을 사용하여 LysCPD2 유전자를 증폭하였다. PCR 프라이머(primer)는 예측된 LysCPD2의 뉴클레오티드 서열 정보를 토대로 제작되었으며, 수월한 제한효소의 처리를 위해 제한효소의 절단 부위를 각 프라이머의 양쪽 말단

부위에 삽입하여 합성하였다 (표 2).

**표 2**

PCR 프라이머 서열

[0053]

프라이머 명칭	프라이머 서열
LysCPD2_N_F_BamHI	5'-GCGGGATCCATGAAAATAGGTATTAGAGACGGAC-3'
LysCPD2_N_R_SalI	5'-GCGGTCGACTTAATTACATTCCTCCACAAAACAATAC-3'

[0055]

클로닝을 진행한 벡터로는 발현 벡터인 pET-28a 플라스미드를 사용하였다. 상기 PCR 산물과 플라스미드를 제한 효소인 BamHI과 SalI을 처리하여 접착 말단(sticky end)을 갖는 선형상태로 만든 후 'pure PCR product purification kit'를 사용하여 정제하였다.

[0056]

정제된 PCR 산물과 벡터는 'Takara'사의 'ligation kit'를 이용해 결합(ligation)하여 재조합 플라스미드인 pET-28a::LysCPD2를 만들었다. 상기 pET-28a::LysCPD2는 대장균(*Escherchia coli*) DH5 $\alpha$  컴피턴트 세포(competent cell)에 '히트 쇼크 형질전환(heat shock transformation)' 방법으로 집어넣었고, 이를 카나마이신(kanamycin) 첨가 배지에 배양하여 벡터가 들어간 세포만 자랄 수 있도록 해주었다. 또한, 항생제 첨가 배지에서 자란 단일 콜로니(single colony)에 대해 콜로니 PCR을 진행함으로써 자가결합(self-ligation)되어 들어간 벡터와 LysCPD2 유전자가 정상적으로 삽입된 벡터를 구분하였다.

[0057]

LysCPD2 유전자가 정상적으로 삽입된 벡터는 다시 한 번 추출하여 유전자 서열 정보가 의도한 것과 정확히 일치하는지 확인하였다. 유전자 서열 정보가 확인된 벡터는 단백질 발현 균주인 대장균(*E. coli*) BL21(DE3)에 히트 쇼크 형질전환을 통해 다시 삽입하였다.

[0058]

단백질 발현은 대장균(*E. coli*) BL21(DE3) 클론을 LB 배지 50ml에 접종하고 37 $^{\circ}$ C, 220 rpm에서 OD<sub>600</sub>값이 1.0이 될 때까지 키운 후, 0.2mM의 IPTG를 넣어주고 다시 30 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 진탕 배양함으로써 이루어졌다. 배양 후, 세포를 원심분리 (7000 $\times$ g, 10분, 4 $^{\circ}$ C)를 통해 가라앉히고, 다시 이를 용균 버퍼(lysis buffer) 50 ml Tris-Cl (pH 8.0), 500 mM NaCl 10ml에 재현탁한 후, 초음파처리를 통하여 용균시켰다.

[0059]

용균 후 원심분리 (21,330 $\times$ g, 60분, 4 $^{\circ}$ C)를 통해 용해되지 않은 단백질을 제거하였고, 이를 Ni-NTA 레진(resin) 1ml과 함께 'Biorad'사의 크로마토그래피 컬럼(chromatography column)에 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 1시간가량 섞어준 뒤 (inverting), 컬럼을 통과시켜 레진에 결합하지 않은 단백질을 제거하였다. 이어서, 10mM, 20mM 이미다졸(imidazole) 용액을 각각 10ml, 5ml씩 순차적으로 컬럼에 통과시켜 비특이적으로 결합한 단백질을 제거하였고, 최종단계에서 250mM 이미다졸 용액이 포함된 용출 버퍼(elution buffer)를 통과시켜 레진에 결합한 LysCPD2를 용리(elution) 시켰다. 얻어진 단백질의 농도는 'Bradford assay'를 통해 확인하였고, SDS-PAGE를 통해 정제도를 확인하였다 (도 3). 이후, 곧바로 'healthcare'사의 'PD miditrap G-25 kit'를 이용하여 저장 버퍼(storage buffer) 0mM Tris-Cl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 30% 글리세롤로 사용 시까지 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 도 3은 본 발명 엔도라이신 LysCPD2의 정제도를 확인한 결과이다.

[0061]

**[실험예 1: 엔도라이신 LysCPD2의 클로스트리디움 퍼프린젠스에 대한 항균 효과 확인과 LysCPD2의 특성 분석]**

[0062]

정제된 단백질 LysCPD2의 클로스트리디움 퍼프린젠스에 대한 항균 효과를 확인하고 특성 분석을 진행하여 최대 항균 효과를 갖는 최적의 NaCl 농도, pH, 온도 조건을 확인하였다. 우선, 항균 효과를 보이는 호스트(host)의 스펙트럼(spectrum)을 확인하기 위해 각 숙주를 오버나잇 배양한 후, 0.7% DW 소프트 아가에 분주한 후 플레이트 상에서 균한 뒤, LysCPD2를 분주하여 용해능을 나타내는 숙주를 확인하였다 (표 3).

**표 3**

LysCPD2의 용해능

[0063]

Bacterial host	LysCPD2
<i>Clostridium perfringens</i> strain	
<i>C. perfringens</i> H3	+
<i>C. perfringens</i> H9	+
<i>C. perfringens</i> FD1	+
<i>C. perfringens</i> ATCC 3624	+



<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	+
<i>C. perfringens</i> FORC 25	+
<i>C. perfringens</i> FORC 3	+
<b>Isolate</b>	
human stool isolate 2582	-
human stool isolate 2585	+
human stool isolate 2589	+
human stool isolate 2722	+
<b>Other Gram positive bacteria</b>	
<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe	-
<i>Staphylococcus aureus</i> RN4220	-
<i>Staphylococcus aureus</i> Newman	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23857	+
<i>Clostridium histolyticum</i> ATCC 19401	-
<i>Clostridium indolis</i> ATCC 25771	-

- [0065] 클로스트리디움 퍼프린젠스 ATCC 13124와 클로스트리디움 퍼프린젠스 FORC 25 (*C. perfringens* ATCC 13124 and *C. perfringens* FORC 25)를 BHI 배지 10ml에 접종하고 37°C에서 OD<sub>600</sub>값이 1.0이 될 때까지 정치 배양하였다. 이를 원심분리 (7000×g, 10분, 4°C)를 통해 가라앉히고, 다시 이를 단백질 정제시 사용한 용균 버퍼 (lysis buffer) 10ml에 재현탁하였다. 96-웰 플레이트에 현탁액 1ml와 LysCPD2 0nM, 50nM, 250nM, 500nM, 산소투과를 저해하기 위해 미네랄 오일 (mineral oil) 500μl를 함께 처리한 뒤 37°C에서 정치배양하고, 40분간 5분마다 OD<sub>600</sub>값을 측정하여 대조군에 대한 상대적 OD<sub>600</sub>값을 나타내었다 (도 4). 도 4는 본 발명 LysCPD2의 농도별(0nM, 50nM, 250nM, 500nM)처리에 따른 클로스트리디움 퍼프린젠스 ATCC 13124와 클로스트리디움 퍼프린젠스 FORC 25의 용해능을 확인한 결과이다.
- [0066] 최적의 NaCl 농도를 확인하기 위해 50mM Tris-Cl (pH 8.0)과 NaCl의 최종 농도 0, 100mM, 200mM, 300mM, 400mM, 500mM, 1000mM 로 이루어진 용액을 반응 버퍼 (reaction buffer)로 사용하였다. 최적의 pH 조건을 확인하기 위해 Universal pH buffer(10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM NaCitate, 10mM H<sub>3</sub>B<sub>3</sub>O<sub>3</sub>)에 5M NaCl과 5M HCl을 넣어 pH 3부터 pH 10에 해당하는 버퍼를 사용하였다.
- [0067] 클로스트리디움 퍼프린젠스 ATCC 13124 (*C. perfringens* ATCC 13124)를 BHI 배지 10ml에 접종하고 37°C에서 OD<sub>600</sub>값이 1.0이 될 때까지 정치 배양하였다. 이를 원심분리 (7000×g, 10분, 4°C)를 통해 가라앉히고, 다시 이를 반응 버퍼(reaction buffer) 10ml에 재현탁하였다. 96-웰 플레이트에 현탁액 1ml와 LysCPD2 250nM을 처리한 뒤 25°C에서 40분간 배양하고, 상대적 용균 활성을 나타내었다 (도 5의 A 내지 B).
- [0068] 마지막으로 최적의 온도 조건을 확인하기 위해 50mM Tris-Cl (pH 8.0)과 100mM NaCl로 이루어진 용액을 반응 버퍼로 사용하였다. 1.5ml 튜브에 위와 같이 처리한 세포 현탁액 1ml와 LysCPD2 50nM을 처리한 뒤 4, 25, 37, 45, 55, 65°C에서 10분간 배양하고, 상온에서 40분간 배양한 후, 상대적 용균 활성을 나타내었다 (도 5의 C). 도 5는 본 발명 LysCPD2의 최적 용균활성 조건을 확인한 결과이다 (A: 최적 PH, 최적 NaCl 농도, C: 최적온도).
- [0069] 실험 결과, LysCPD2는 pH 7부터 pH 10 사이에서 50% 이상 항균활성이 나타났으며 pH 9에서 가장 강한 용균활성 (lytic activity)을 보였다. 또한, NaCl 농도 0nM부터 500mM 사이에서 항균 활성이 나타났으며 100mM 농도에서 가장 강한 용균활성을 보였고, 37°C의 조건에서 최대 활성을 가짐을 확인하였다.
- [0070] 또한, 본 실험에서는 LysCPD2의 아미다제 활성을 조사하였다. 아미다제 활성은 N-아세틸무람산 (N-acetylmuramic acid)로부터 유리된 락틱 그룹(lactic group)을 측정하는 방법을 통해 평가되었다.
- [0071] 정제된 LysCPD2를 클로스트리디움 퍼프린젠스 FORC 25에서 추출한 펩티도글리칸에 처리하였을 때, 펩티도글리칸의 N-아세틸무람산과 L-알라닌 (L-alanine) 사이의 아미드(amide) 결합이 끊어지면서 유리 무람산 (muramic acid)이 증가함을 확인하였다 (도 6). 도 6은 본 발명 LysCPD2의 아미다제 활성을 확인한 결과이다.
- [0072] 추가적으로, LysCPD2의 내열성에 기반하여 LysCPD2와 함께 열을 가해 활성화시킨 포자에 대한 용해능을 확인하였다. 1×10<sup>6</sup> CFU/ml의 포자 현탁액 1ml에 LysCPD2 250nM을 처리한 뒤, 포자의 발아조건인 75°C에서 20분간

배양하고, BHI 아가 배지에서 12시간 동안 37°C에서 배양 후 형성된 콜로니(colony) 수를 측정하였다. 실험 결과, LysCPD2를 처리하지 않은 대조군에 비해 약 7 log CFU/ml의 차이를 나타내어 열에 의해 활성화된 포자에 대한 용해능을 확인하였다. 도 7은 본 발명 LysCPD2의 내열성에 기반하여 LysCPD2와 함께 열을 가해 활성화시킨 포자에 대한 용해능을 확인한 결과이다.

[0074] [실험예 2: 엔도라이신 LysCPD2의 내열성 측정]

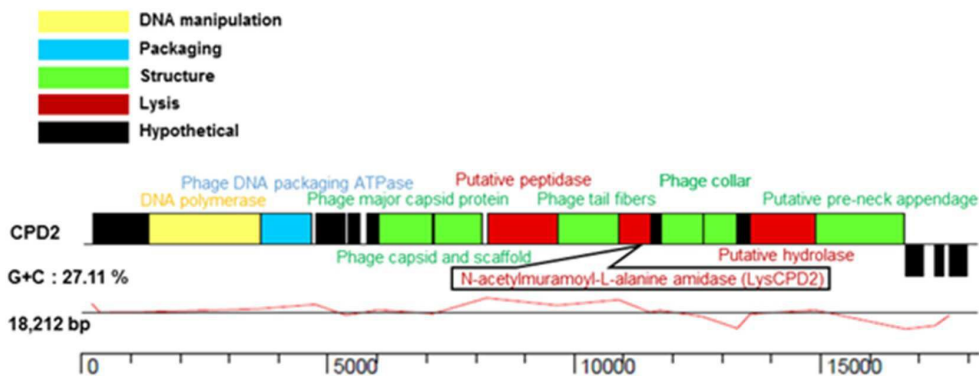
[0075] 엔도라이신 LysCPD2의 내열성을 알아보기 위해 4°C, 25°C, 37°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C, 95°C의 온도에서 보관한 뒤, 효소활성을 측정하였다.

[0076] 상기 실험예 1의 과정에서 명시한 바와 같이 클로스트리디움 퍼프린젠스 ATCC 13124 (*C. perfringens* ATCC 13124)를 BHI 배지 10ml에 접종하고 37°C에서 OD<sub>600</sub>값이 1.0이 될 때까지 정치 배양하였다. 이를 원심분리 (7000 ×g, 10분, 4°C)를 통해 가라앉히고, 다시 이를 반응 버퍼(reaction buffer) 50mM Tris-Cl (pH 8.0), 100mM NaCl 10ml에 재현탁하였다. 96-웰 플레이트에 현탁액 1ml와 각각의 온도에서 보관한 LysCPD2를 250nM 처리한 뒤 상온에서 40분간 배양하고, 상대적 용균 활성을 나타내었다 (도 8. A 내지 B).

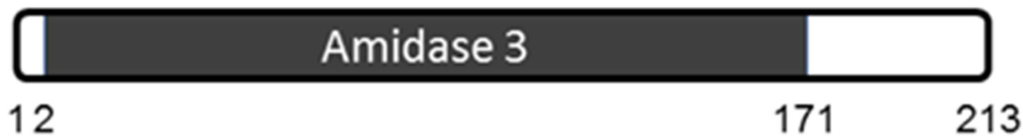
[0077] 도 8은 본 발명 LysCPD2의 내열성을 측정한 결과이다 (A: 10분, B: 30분). 이때, 10분 보관 시에는 95°C에서도 최대 활성의 약 80%의 활성을 보였으며, 30분 보관했을 시에는 65°C부터 활성이 감소하였으나, 85°C까지 50%의 활성을 유지하였다.

도면

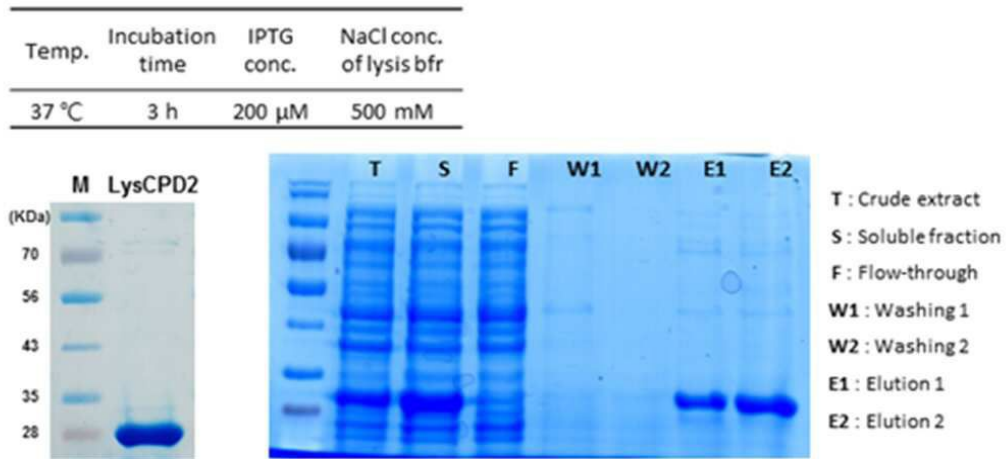
도면1



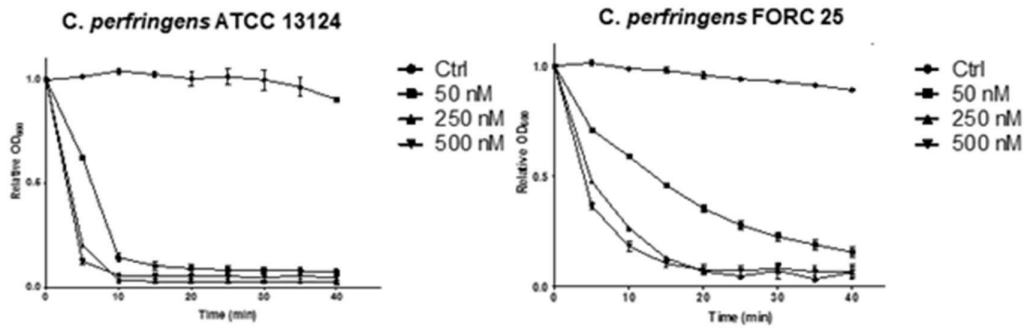
도면2



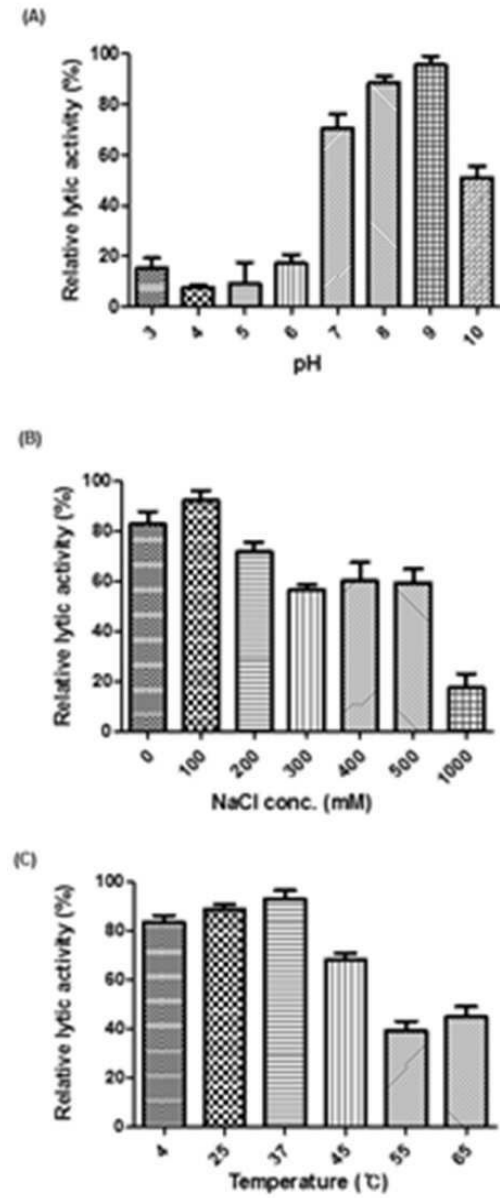
도면3



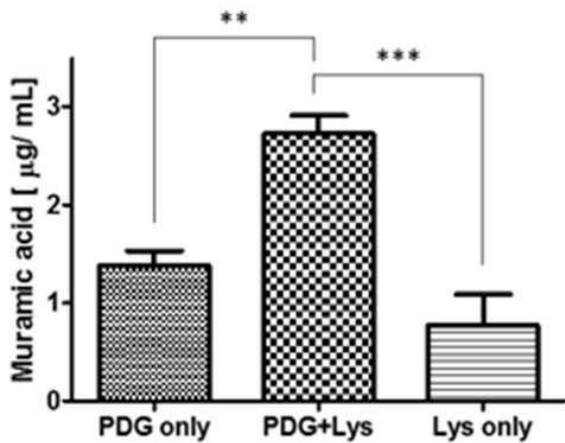
도면4



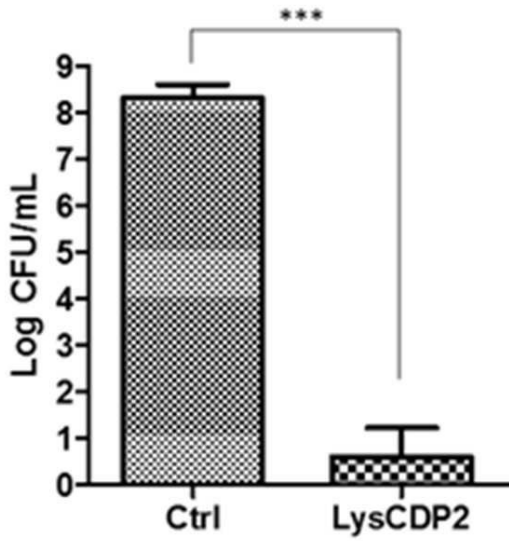
도면5



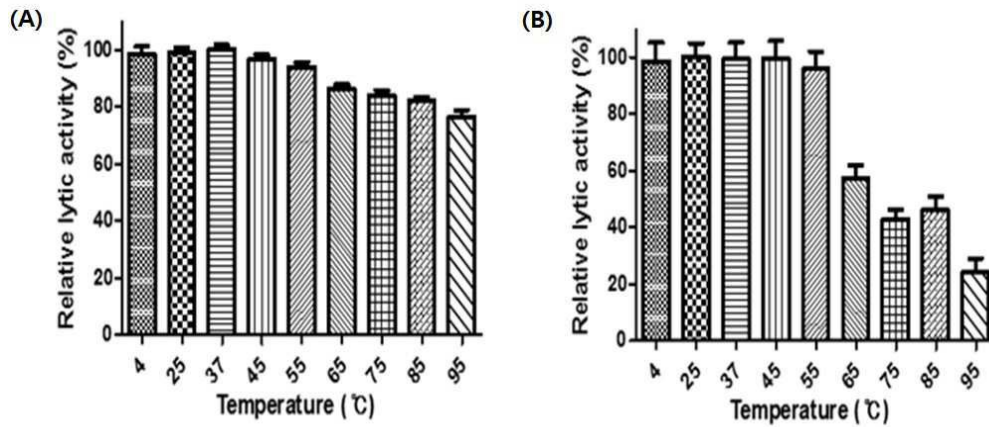
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Seoul National University R&DB Foundation
- <120> Thermal stable endolysin LysCPD2 with lytic activity against Clostridium perfringens
- <130> YP-18-274
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 639
- <212> DNA
- <213> Clostridium perfringens
- <400> 1

atgaaaatag gtattagaga cggacatagt ccaaattgta aggggtgctat tggtttacgt 60  
 gatgaacaat catgatgag agttttatgt aaagaggtta tagaatatt agaaaaacat 120  
 gggcatgagg tagtttatgt tggtagtgat gcaagtacac aaaatggtga actttcagaa 180  
  
 ggtgtaagaa aagctaataa ttcaaatggt gatatatatta tttcattgca catgaatagc 240  
 tttaatgggc aagcccaagg aacagaggca cttgttacag ttggagcaag aaattctata 300  
 aaagaaattg cctcaagggt atgcaaaaac tttgctagtt taggtttagt aaataggggt 360  
 gtaaaagaag ttaatttata tgaatgaag aacgtaaaag cacccaacat aatatttgaa 420  
 actatgtttt gcgataacc ccatgacatt aacgaagttt ggtcgcctac accatacgaa 480  
 aaaatggctt tactaattgc aaatgctatt gacccaacta ttaaagaaaa tgaactttat 540  
 agagttgttg ttcaatattt taacaacaaa aaagatgctg aaaactgtca acaagaatt 600

gctaaaagat ggtattgttt tgtggaggaa tgtaattaa 639

- <210> 2
- <211> 212
- <212> PRT
- <213> Clostridium perfringens
- <400> 2

Met Lys Ile Gly Ile Arg Asp Gly His Ser Pro Asn Cys Lys Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Leu Arg Asp Glu Gln Ser Cys Met Arg Val Leu Cys Lys Glu  
 20 25 30  
 Val Ile Glu Ile Leu Glu Lys His Gly His Glu Val Val Tyr Cys Gly  
 35 40 45  
  
 Ser Asp Ala Ser Thr Gln Asn Gly Glu Leu Ser Glu Gly Val Arg Lys  
 50 55 60  
 Ala Asn Asn Ser Asn Val Asp Ile Phe Ile Ser Leu His Met Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Phe Asn Gly Gln Ala Gln Gly Thr Glu Ala Leu Val Thr Val Gly Ala  
 85 90 95  
 Arg Asn Ser Ile Lys Glu Ile Ala Ser Arg Leu Cys Lys Asn Phe Ala  
 100 105 110  
 Ser Leu Gly Leu Val Asn Arg Gly Val Lys Glu Val Asn Leu Tyr Glu

115	120	125					
Met Lys Asn Val	Lys Ala Pro Asn Ile Ile Phe Glu Thr Met Phe Cys						
130	135	140					
Asp Asn Pro His Asp Ile Asn Glu Val Trp Ser Pro Thr Pro Tyr Glu							
145	150	155	160				
Lys Met Ala Leu Leu Ile Ala Asn Ala Ile Asp Pro Thr Ile Lys Glu							
165	170	175					
Asn Glu Leu Tyr Arg Val Val Val Gln Tyr Phe Asn Asn Lys Lys Asp							
180	185	190					
Ala Glu Asn Cys Gln Gln Glu Ile Ala Lys Arg Trp Tyr Cys Phe Val							
195	200	205					
Glu Glu Cys Asn							
210							