



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월22일

(11) 등록번호 10-2342719

(24) 등록일자 2021년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A01N 37/46 (2006.01)

A01N 63/20 (2020.01) C12P 21/02 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2021.05)

A01N 37/46 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0088707

(22) 출원일자 2020년07월17일

심사청구일자 2020년07월17일

(56) 선행기술조사문헌

Journal of Industrial Microbiology. 1995, vol. 15, pp. 60-65.

Parasitol. Res. 2012, vol. 111, pp. 2473-2477.

Antonie van Leeuwenhoek. 2005, vol. 87, pp. 37-42.

CHIMIA International Journal for Chemistry, 2020.05., vol. 74, no. 5, pp. 382-390.

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

김승범

대전광역시 서구 둔산남로 127 목련아파트 104동 407호

김민지

대전광역시 대덕구 계족산로 136 선비마을아파트 518동 403호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인주원

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 마이크로모노스포라 속 균주를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물

(57) 요약

본 발명은 토양에서 분리한 세균인 마이크로모노스포라(*Micromonospora*) 속 R.77 균주 또는 이로부터 생산되는 항생물질인 에키노마이신(echinomycin)에 대한 내용이다. 에키노마이신은 기존에 다른 세균인 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속 균주에 의해서만 생산되는 이차대사산물로 알려졌다. 본 발명에서는 다른 종류의 세균에서 생산하는 것을 확인하였다. 또한 R.77 균주가 생산하는 이차대사산물의 거의 대부분이 에키노마이신으로 확인되어 높은 수율로 에키노마이신을 생산할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01N 63/20 (2020.01)

C12P 21/02 (2013.01)

C12R 2001/01 (2021.05)

(72) 발명자

이지혜

대전광역시 대덕구 우암동로18번길 39

오동찬

서울특별시 강남구 개포로110길 15 우성7차아파트
112동 703호

황성훈

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 관악학생
생활관 903동 707호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711087511

과제번호 2018R1A4A1021703

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 재단법인 한국연구재단

연구사업명 기초연구실지원사업

연구과제명 특이 환경 미생물 유래 생리활성물질 기초연구실

기 여 율 1/1

과제수행기관명 서울대학교

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

항균 활성을 가지는 기탁번호가 KCTC14227BP인 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항균은 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 디프테리아균(*Corynebacterium diphtheriae*), 고초균(*Bacillus subtilis*), 대변장구균(*Enterococcus faecalis*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*) 중 어느 하나 이상에 대한 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 4

제1항 또는 제3항의 기탁번호가 KCTC14227BP인 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 향균용 조성물

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 추출물은 아세톤, 클로로포름, 에탄올, 에틸아세테이트, 헥산 또는 메탄올에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 향균용 조성물

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 추출물은 메탄올로 추출한 것을 특징으로 하는 향균용 조성물

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 항균은 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 디프테리아균(*Corynebacterium diphtheriae*), 고초균(*Bacillus subtilis*), 대변장구균(*Enterococcus faecalis*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*) 중 어느 하나 이상에 대한 것을 특징으로 하는 향균용 조성물

청구항 8

제4항에 있어서, 추가의 항균 성분을 1종 이상 더 함유하는 것을 특징으로 하는 향균용 조성물

청구항 9

기탁번호가 KCTC14227BP인 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주를 배양하는 단계;

이의 추출물을 제조하는 단계; 및

에키노마이신을 분리하는 단계를 포함하는 에키노마이신의 제조 방법

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 추출물은 아세톤, 클로로포름, 에탄올, 에틸아세테이트, 헥산 또는 메탄올에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 에키노마이신의 제조 방법

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 추출물은 메탄올로 추출한 것을 특징으로 하는 에키노마이신의 제조 방법

청구항 12

기탁번호가 KCTC14227BP인 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주로부터 분리한 에키노마이신을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 항균은 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 디프테리아균(*Corynebacterium diphtheriae*), 고초균(*Bacillus subtilis*), 대변장구균(*Enterococcus faecalis*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*) 중 어느 하나 이상에 대한 것을 특징으로 하는 항균용 조성물

청구항 14

제12항에 있어서, 추가의 항균 성분을 1종 이상 더 함유하는 것을 특징으로 하는 항균용 조성물

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항균 효과를 나타내는 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주 또는 상기 균주로부터 분리된 에키노마이신의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 기존에 알려진 많은 수의 항생물질이 방선균으로부터 분리되었다. 그중에서도 스트렙토마이세스(*Streptomyces* sp.) 속의 방선균은 화학 구조적인 면에서나 생리활성의 측면에서 가장 다양한 항생물질을 생성한다고 알려져 있다. 그러나 최근에 와서는 새로운 항균 활성물질을 탐색하기 위한 방안의 하나로 희소 방선균으로 알려져 있는 방선균류에 대한 탐색이 시도되고 있다. 특히 희소방선균 가운데 마이크로모노스포라(*Micromonospora* sp.) 속의 방선균은 다양한 생리활성 물질을 생성할 가능성이 높음에도 불구하고 아직까지 항생제와 관련한 연구는 많이 이루어지지 않고 있다.

[0004] 마이크로모노스포라 속의 방선균은 다양한 환경과 종류의 토양시료, 담수, 식물과 동물 공생 등 다양한 방식과 다양한 환경에 분포하고 있다고 알려져 있다. 특히, 토양에서 분리된 마이크로모노스포라 속 미생물의 경우 유용 항균제를 생산하는 것으로 알려져 있어, 꾸준한 연구가 지속되어 왔다. 또한, 식물 근부에 공생하는 마이크로모노스포라 속 미생물의 경우에는 유용 효소의 보고이며, 공생체 내에서의 역할에 대한 연구가 진행 중이다. 지금까지 마이크로모노스포라 속의 방선균에서는 아미노글리코시드(aminoglycoside)계 항생균 활성물질인 겐타마이신(gentamicin)이 마이크로모노스포라 펄퍼리아(*Micromonospora purpurea*)와 마이크로모노스포라 에치노스포라(*M. ethinosporea*)에서 발견된 이래로 다양한 아미노글리코시드계 항생균물질이 개발되었다. 후에 마크로라이드계(macrolide) 항생물질인 메갈로마이신(megalomicin), 로자라마이신(rosaramicin) 주베니마이신(juvenimicins)이 개발되었고, 이오딘인(iodinin), 테트레놀린(tetrenolin), 보트로마이신(bottromycin) 등 다양한 종류의 항생물질이 마이크로모노스포라 속의 여러 종의 방선균으로부터 발견되었다. 그러나 에키노마이신(echinomycin)과 같은 퀴녹살린(quinoxaline)계 항생물질이 마이크로모노스포라 속의 방선균에서 발견된 바는 아직 없었다.

[0005] 에키노마이신(NSC526417)은 원래 1957년 스트렙토마이세스 에키나투스(*Streptomyces echinatus*)로부터 분리된 퀴녹살린(quinoxaline)계통의 일원이다. 이 계통의 화합물은 매우 강력한 항균, 항암 및 항 바이러스 활성을 지니기 때문에 큰 관심을 받고 있다. 에키노마이신은 HIF1 α 의 DNA-결합 활성을 저해하는 작은 분자이다. 에키노마이신은 생체 외 및 생체 내에서 B16 흑색종 및 P338 백혈병이 이식된 마우스의 종양에 대하여 및 인간 종양세포의 성장에 대하여 항종양 활성을 보이는 것으로 나타났다. 또한 에키노마이신은 백혈병 줄기세포를 우선적으로

로 제거함으로써 이중 모델 내의 마우스의 급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia)과 인간 급성 골수성 백혈병 (acute myeloid leukemia)을 효과적으로 근절시키는 것으로 나타났다.

[0006] 한국등록특허 제163660호는 마이크로모노스포라 속 SA-246 균주를 이용한 항균-항암활성을 갖는 SAPH 유도체의 제조방법에 관해 개시하고 있고, 한국등록특허 제327510호는 식물병원 진균에 항균활성을 가지는 마이크로모노스포라 코에투리아 에이오58 균주 및 이 균주로부터 생산되는 항생물질의 제조방법에 관해 개시하고 있으며, 한국등록특허 제2087786호는 항균 및 항암 기능을 가지는 물옥잠 분리 마이크로모노스포라 속 M2 균주 및 이의 용도에 관해 개시하고 있다.

[0007] 하지만, 본 발명의 항균 효과를 나타내는 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주 및 이의 항균 효과에 관해 개시된 바는 없다. 또한 상기 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주로부터 에키노마이신을 분리하는 방법에 대해서는 아직까지 개시된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제163660호

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제327510호

(특허문헌 0003) 한국등록특허 제2087786호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주, 이의 추출물의 항균효과 및 상기 균주로부터 분리한 항균 물질인 에키노마이신의 존재를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 항균 활성을 가지는 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주를 배양하는 단계; 추출물을 제조하는 단계; 및 에키노마이신을 분리하는 단계를 포함하는 에키노마이신의 제조방법을 제공한다.

[0015] 또 다른 예로, 본 발명은 상기 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주로부터 분리한 에키노마이신을 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주, 이의 추출물은 항균 효과를 나타내므로, 항균제로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주로부터 분리한 에키노마이신은 항세균, 항바이러스 및 항암효과를 나타내고 있는 생리활성 물질이며, 기존에 스트렙토마이세스 속에서만 생산되는 것으로 알려졌으나, 본 발명에서 마이크로모노스포라에 속하는 새로운 생산원을 발굴하였다. 해당 균주는 주된 이차대사산물로 에키노마이신을 생산하는 것을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 일 구현 예에 따른 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77의 콜로니 형태를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 구현 예에 따른 16S rRNA 유전자 염기서열에 기반한 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주의 분류학적 위치를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 구현 예에 따른 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주의 항미생물활성 검정 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 구현 예에 따른 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주 배양액 추출물의 TLC (A) 및 bioautography (B) 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 구현 예에 따른 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주 배양액 추출물에 대한 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 구현 예에 따른 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주 추출물의 질량스펙트럼 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 구현 예에 따른 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주의 메탄올 추출물 분리성분과 에키노마이신의 UV 스펙트럼을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 구현 예에 따른 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주의 메탄올 추출물의 성분을 분석한 ^1H NMR 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 구현 예에 따른 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주의 에키노마이신을 분석한 ^1H NMR 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항균 활성을 가지는 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주를 제공한다.
- [0021] 상기 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주는 금강 주변 강변 토양에서 방선균에 속하는 세균을 분리하였으며, 분리 균주들을 대상으로 16S 리보솜 RNA (16S rRNA) 염기서열을 분석하여 이에 기반한 동정을 실시하였고, 이중 마이크로모노스포라 R_77 균주를 확보하여 배양하였으며, 그 배양체로부터 다양한 항균활성을 확인하였다. 선별된 균주의 기탁번호는 KCTC 14227BP이다.
- [0022] 본 발명에서 상기 균주 또는 이의 대사물질은 상기 균주의 균체, 상기 균주의 배양액(배양물), 상기 균주의 배양여액, 상기 배양물의 추출물 등의 상태로 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 여기서 상기 균주의 균체는 균 자체를 모두 포함하는 의미이며, 상기 배양액은 균체가 포함된 배양액을 의미하며, 상기 배양여액은 균체 비포함 배양액을 의미하고, 상기 배양액의 추출물은 유기용매를 사용하여 추출된 후 농축 또는 건조된 것을 의미한다.
- [0023] 본 발명에서, '항균 활성'은 유해 세균의 생육을 저해 또는 억제하는 활성을 의미한다. 바람직하게는 생체 내 소화기관에 존재하면서 소화기관과 관련된 여러 질환을 유발하는 유해 세균의 생육을 저해 또는 억제하는 활성을 의미하거나, 피부 표면의 세균 및 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 가짐으로써 각종 피부 질환의 예방, 개선 또는 치료 용도 및 항생제 내성 완화 용도로 사용될 수 있는 것을 의미하거나 또는 동식물을 포함한 생명체의 외부에 일상적으로 노출이 되는 균의 활성, 성장 또는 생육을 저해하는 활성을 의미한다.
- [0024] 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 항균 활성은 그람 음성균 또는 그람 양성균을 구분하지 않고 광범위한 항균 활성일 수 있고, 바람직하게는 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 디프테리아균(*Corynebacterium diphtheriae*), 고초균(*Bacillus subtilis*), 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*), 살모넬라균(*Salmonella enterica*), 영균(*Serratia marcescens*), 대장균(*Escherichia coli*), 대변장구균(*Enterococcus faecalis*), 엔테로박터 클로아케(*Enterobacter cloacae*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 페니실리움 알보코레미움(*Penicillium albocoremium*), 인삼점무늬병균(*Alternaria panax*), 잎집무늬마름병균(*Rhizoctonia solani*), 균핵병균(*Sclerotinia minor*), 고추탄저병균(*Colletotrichum acutatum*)에 대한 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 디프테리아균(*Corynebacterium diphtheriae*), 고초균(*Bacillus subtilis*), 대변장구균(*Enterococcus faecalis*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 칸디다

알비칸스(*Candida albicans*), 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*)에 대한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0025] 또한, 본 발명은 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주로부터 분리한 에키노마이신을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주의 추출물에서, 추출 용매는 아세톤, 클로로포름, 에탄올, 에틸아세테이트, 헥산 및 메탄올에서 선택된 하나 이상의 용매일 수 있고, 바람직하게는 메탄올일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명에서 상기 조성물은 의약품 또는 의약품의 형태로 제공될 수 있다. 의약품의 형태일 경우에는, 본 발명의 미생물 또는 이의 배양물 뿐만 아니라, 항균 활성을 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명에서의 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 임의의 대상 조성물 또는 성분을 하나의 기관 또는 신체의 부분으로부터 다른 기관, 또는 신체의 부분으로의 운반 또는 수송하는 것에 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 제약상 허용 가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭하며, 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 스테아린산 마그네슘 및 광물유를 들 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 화학식 1 또는 2의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 병원성 세균 및 내성균에 대한 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 바람직하게 의약품 조성물일 수 있다. 본 발명의 조성물이 의약품의 형태일 경우에는, 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 상기 의약품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충전제, 마스크, 연고제 또는 필터 충전제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 또한, 본 발명은 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주를 배양하는 단계; 추출물을 제조하는 단계; 및 에키노마이신을 분리하는 단계를 포함하는 에키노마이신의 제조방법을 제공한다.
- [0034] 상기 균주의 배양 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있으며, 특정 방법에 특별히 제한되는 것은

아니다.

[0036] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0038] **실시예 1. 균주의 분리**

[0039] *Micromonospora* sp. R_77을 금강 주변 토양으로부터 분리하였다. 분리 과정은 토양 현탁액을 Humic acid vitamin agar medium (0.012 g FeSO₄; 0.024 g CaCO₃; 0.06 g MgSO₄; 0.6 g Na₂HPO₄; 2.052 g KCl; 144 ml Humic acid supplement; 6 ml Bennett's agar supplement; 18 g agar; 증류수 1L; Bennett's agar supplement는 멸균 후 첨가)에 접종한 후, 30° C에서 2주 간 배양하여 나타난 콜로니를 순수배양을 통해 분리하였다.

[0041] **실시예 2. 분리 균주의 동정 및 생리적 특성 분석**

[0042] 1) 균주의 동정

[0043] 분리된 균주로부터 DNA를 추출한 후 이를 주형으로 16S rRNA 유전자를 PCR 증폭하였다. PCR 증폭에 사용한 primer는 27F(5' -AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R(5' -GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')였고, 증폭된 PCR 산물을 정제한 후 염기서열을 분석하였다. 확보한 염기서열은 GenBank 및 EzTaxon을 이용하여 동정하였다.

[0045] 2) 균주의 생리적 특성 분석

[0046] 분리균주의 생장 관련 생리적 특성을 조사하기 위해 pH (4-11), 온도 (4-45° C) 및 NaCl(0-6%)의 농도를 각각 달리 한 배지에서 배양하여 각 조건에서의 생장 범위 및 최적 생장조건을 측정하였다. 또한, 균주의 기질 및 효소 활성을 평가하기 위해 API 20NE kit를 이용하였다.

[0048] **실시예 3. 항균활성 검정**

[0049] 1) 균주의 배양

[0050] 균주는 ISP 7 배지(1 g L-Asparagine; 0.5 g L-tyrosine; 0.5 g K₂HPO₄; 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O; 0.5 g NaCl; 1.360 mg FeSO₄ · 7H₂O; 0.027 mg CuCl₂ · 2H₂O; 0.04 mg CoCl · 6H₂O; 0.025 mg Na₂MoO₄; 0.02 mg ZnCl₂; 2.850 mg H₃BO₃; 1.8 mg MnCl₂ · 4H₂O; 1.770 mg Na₂C₄H₄O₆; 20 g agar; 증류수 1L)에 도말하여 30℃에서 1주일 간 배양하였다.

[0052] 2) Soft agar overlay 방법을 이용한 항균활성 스크리닝

[0053] 균주의 현탁액을 ISP 7 agar, ISP 2 agar, Starch casein agar 배지에 접종하고 7일간 30℃에서 배양하였다. 0.8% TSA (Soft agar)에 O.D=0.2로 설정한 병원균을 섞어 배양한 plate 위에 overlay 한 후 나타난 저해환 지름의 크기를 측정하여 항균활성 스크리닝을 진행하였다.

[0055] 3) 물질 추출을 위한 최적배양조건 탐색

[0056] 물질 추출을 위한 최적 배지 조건을 탐색하기 위해, ISP 2 (0.2 g yeast extract; 0.2 g glucose; 0.5 g malt extract; 증류수 1L), ISP 7, Muller Hinton, GSS 액체 배지에 대해 항균활성을 평가하였다. 최적 pH 조건을 탐색하기 위해 pH 5 - 11의 범위에서 항균활성을 평가하였고, 최적 배양 기간을 확인하기 위해서는 4 - 14일로 그 범위를 설정하여 실험을 수행하였다. 모든 실험은 동일하게 배양된 균주를 1L의 삼각 플라스크에 접종하여 30℃의 shaking incubator에 150 rpm의 각 조건으로 배양하여 disc diffusion assay로 최적배양조건을 찾아주었다.

[0057] 그 후, 최적 추출 용매 조건을 알아보하고자 hexane, methanol, ethanol, ethyl acetate, acetone, chloroform의 6가지 유기용매로 최적배양조건으로 배양한 균주의 배양체를 대상으로 물질 추출을 진행하여 disc diffusion assay로 확인하였다.

[0059] 4) 종이디스크를 이용한 항생활성 검정

[0060] 상기 배양액을 원심분리하여 세포 배양체와 상등액으로 분리하였다. 그 중 배양체는 메탄올을 첨가하여

rotator에서 2시간동안 교반하여 배양체의 항균활성 물질을 추출한 후, Whatman No.2를 이용해 여과하고 회전농축기로 농축하였다. 농축액을 멸균된 지름 8 mm의 원형 종이디스크에 떨어뜨린 후 검정대상 미생물을 도말한 한천배지에 올려놓은 후 배양하였다. 항생활성 검정에 이용된 미생물은 표 1 에 나타내었다. 항생활성은 종이디스크를 중심으로 성장저해환의 생성 여부 및 저해환의 지름의 측정을 통해 결정하였다 (그림 1).

표 1

항균활성 검정대상 균주

구 분	학 명	균주기호
그램양성세균	<i>Micrococcus luteus</i>	CCARM 0022
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CCARM 3089
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	KCTC 3075
	<i>Bacillus subtilis</i>	KACC 14741
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KCTC 2208
그램음성세균	<i>Salmonella enterica</i>	KCTC 12456
	<i>Serratia marcescens</i>	KCTC 12457
	<i>Escherichia coli</i>	KCTC2441
	<i>Enterococcus faecalis</i>	V583
	<i>Enterobacter cloacae</i>	KCTC 2361
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCARM 0222
효모	<i>Candida krusei</i>	CCARM 14017
	<i>Candida albicans</i>	KCTC 7270
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BY4741
사상성 진균	<i>Penicillium albocoremium</i>	KACC 43468
	<i>Alternaria panax</i>	KACC 42141
	<i>Rhizoctonia solani</i>	KACC 40101
	<i>Sclerotinia minor</i>	KACC 41066
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	KACC 40042

실시예 4. 물질 동정

1) Thin Layer Chromatography (TLC)

배양체 추출액을 농축하여 10cm X 20cm의 TLC plate(Merck, KGaA, Germany)을 고정상으로, 클로로포름:메탄올:물(80:18:2) 혼합액을 전개용매로 하여 1시간 동안 전개 하였다. 이렇게 전개 하여 분리된 물질들은 UV 254nm에서 관찰 하였으며, 항균활성을 가진 분획을 확인하기 위해서 Bio-autography assay를 수행하였다.

2) High performance liquid chromatography (HPLC)

TLC 결과 얻어진 활성을 가진 분획의 분리를 위하여 HPLC를 이용하였다. 컬럼은 Agilent Eclipse C-18(250mm X 4.6mm)를 이용하였고, 이동상은 water : acetonitrile의 1:1 혼합액을 이용하여 분당 1ml의 유속으로 전개하였으며, 검출은 UV detector 244nm를 이용하였다.

3) 기기분석에 기반한 동정

HPLC-MS를 이용해 물질의 분자량을 추정하였고, UV-spectra 및 nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy 분석을 통해 정확한 물질의 분석을 진행하였다.

실험예 1. 균주의 분리, 동정 및 생리적 특성

1) 균주의 분리

R_77 균주는 한천 배지 상에서 노란 색의 콜로니를 형성하였다 (도 1).

2) 동정 결과

16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 동정한 결과 분리주 R_77은 *Micromonospora avicenniae*와 99.00%의 염

기서열 상동성을 보였다 (도 2).

[0081] 3) 생리적 특성

[0082] 분리주는 pH 6 및 30° C의 온도 범위, 그리고 0-1%의 NaCl 농도에서 최적으로 성장하는 것으로 나타났다. 이용 가능한 탄소원 성분은 Glucose, Mannose, Maltose, Malate, Phenyl-acetate였으며, 질소원 성분은 L-Alanine, L-Arginine, L-Aspartic acid, L-Phenylalanine, L-Asparagine, L-Histidine, L-Isoleucine, L-Cysteine, L-Serine, L-Threonine, L-Valine이었다.

[0084] 실험예 2. 항균활성 검정

[0085] Soft agar overlay method를 이용한 분리 균주의 항균활성 스크리닝 결과는 각 배지별로 색깔의 차이로 저해 정도를 나타내는 heatmap으로 표기하였다. 결과를 통해 R_77 균주는 그람양성세균과 효모균에 대해 높은 활성을 나타내는 것을 알 수 있다 (도 3). 이를 바탕으로 확인한 물질추출을 위한 최적 항균활성 조건은 ISP 2 medium pH 7로 13일 간 배양한 균주였으며, 최적 추출용매는 methanol과 ethyl acetate임을 알 수 있었다 (표 2-3). 이후 진행된 모든 실험은 최적 배양조건으로 얻은 배양체를 이용하여 추출한 methanol extract로 수행하였다.

표 2

물질 생산 최적 배지 선정을 위한 실험 결과

	배지 별 저해 반경 (mm)			
	ISP 2	GSS	MH	ISP 7
그람양성세균				
<i>Micrococcus luteus</i> CCARM 0022	2.5	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3089	6	-	-	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> KCTC 3075	8.5	2	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> KACC 14741	3.5	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	3	-	-	-
그람음성세균				
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2208	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> KCTC 12456	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> KCTC 12457	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> KCTC 2441	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> KCTC 2361	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 0222	-	-	-	-
효모균				
<i>Candida krusei</i> CCARM 14017	3.5	-	-	-
<i>Candida albicans</i> KCTC 7270	3	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741	-	-	4	-

표 3

물질 생산을 위한 최적 조건(배양 pH, 배양기간 및 추출 용매) 탐색 결과

	저해반경 (mm)
pH	
pH 5	0
pH 6	4
pH 7	11
pH 8	0
pH 9	0
pH 10	0
pH 11	0
배양기간	
Day 4	9
Day 5	13

Day 6	11
Day 7	13
Day 8	12
Day 9	13
Day 10	13
Day 11	12
Day 12	14
Day 13	14.5
Day 14	12.5
추출용매	
Acetone	10
Chloroform	12
Ethanol	14
Ethyl acetate	15
Hexane	11
Methanol	15

[0091] 실험예 3. 활성물질의 분리 및 동정

[0092] 1) 박막크로마토그래피(TLC) 및 bioautography 분석

[0093] 추출한 Methanol extract를 대상으로 TLC 후 UV 상에서 관찰한 결과 5개의 밴드들이 나타났고, 어떤 밴드에서 항균활성을 나타내는지 알아보기 위해 C. diphtheriae에 대한 bioautography 결과 플레이트의 가장 위쪽 밴드에서 활성이 나타난 것을 알 수 있다 (도 4). 더 정확한 물질의 특성 분석을 위해 HPLC-MS와 UV-spectrum 분석을 진행하였다.

[0095] 2) 고성능액체크로마토그래피(HPLC)-MS 및 UV-spectrum 분석

[0096] Methanol extract 를 대상으로 HPLC 를 진행해 본 결과, retention time 13-14분대에 peak이 관찰되었고 (도 5), 이 peak에 대한 질량분석 결과 약 1100 Da의 분자질량을 갖는 항생제 echinomycin임이 확인되었다 (도 6). 이 결과를 바탕으로 methanol extract로부터 분리한 물질 (청색선)과 UV library에 등록되어 있는 standard echinomycin UV 스펙트럼 (적색선) 간의 비교 분석 결과 약 244, 324 nm에서 동일한 λ_{max} 를 보이는 특징과 일치하는 개형을 나타내므로 두 물질은 동일한 물질인 것을 알 수 있다. (도 7).

[0098] 3) Methanol extract와 echinomycin의 핵자기 공명 (NMR) 분석 결과

[0099] HPLC-MS 및 UV-spectrum 데이터를 통해 추정된 결과의 추가 분석을 위해 정확한 구조 예측을 위해 ^1H NMR 실험을 실시했다. 앞의 HPLC-MS를 통해 methanol extract가 잠정적으로 항생제 echinomycin인 것으로 확인되었고, 비교 실험을 통해 다양한 성질을 분석한 결과 둘 다 매우 유사한 성질을 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 후속 ^1H NMR 실험은 methanol extract와 echinomycin 모두에 대해 수행되었다. ^1H NMR 실험은 두 물질에 풍부하게 존재하는 화학 물질의 그룹 간 유사성에 초점을 맞추기 위해 수행되었다 (도 8, 9). 예를 들어, 0-1.5ppm, 2.0-3.5ppm, 4.5-5.5ppm, 6.0-10.0ppm chemical shift 지역에서 두 물질 간에 정확히 일치하는 유사성이 나타났다. 이에 따라 methanol extract로부터 분리된 물질과 echinomycin은 동일한 물질로 간주되었다.

[0101] 이상, 본 발명을 예시적으로 설명하였으며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 변형이 가능할 것이다. 따라서, 본 명세서에 개시된 실시예들은 본 발명을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 사상과 범위가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 보호범위는 아래의 청구범위에 의해서 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술은 본 발명의 권리범위에 포함하는 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0103]

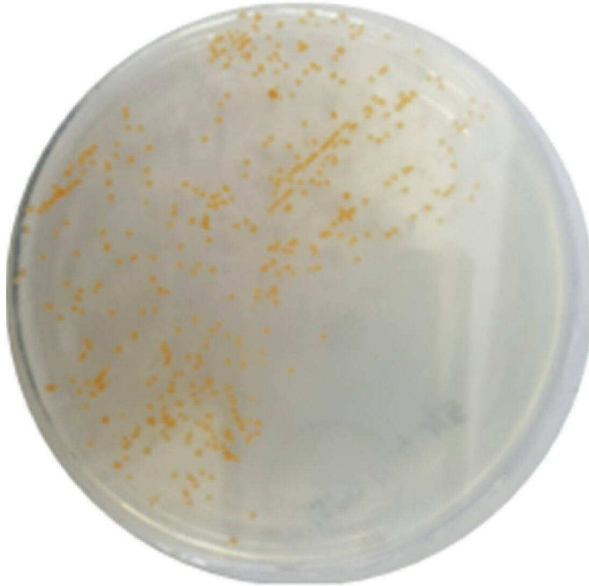
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC14227BP

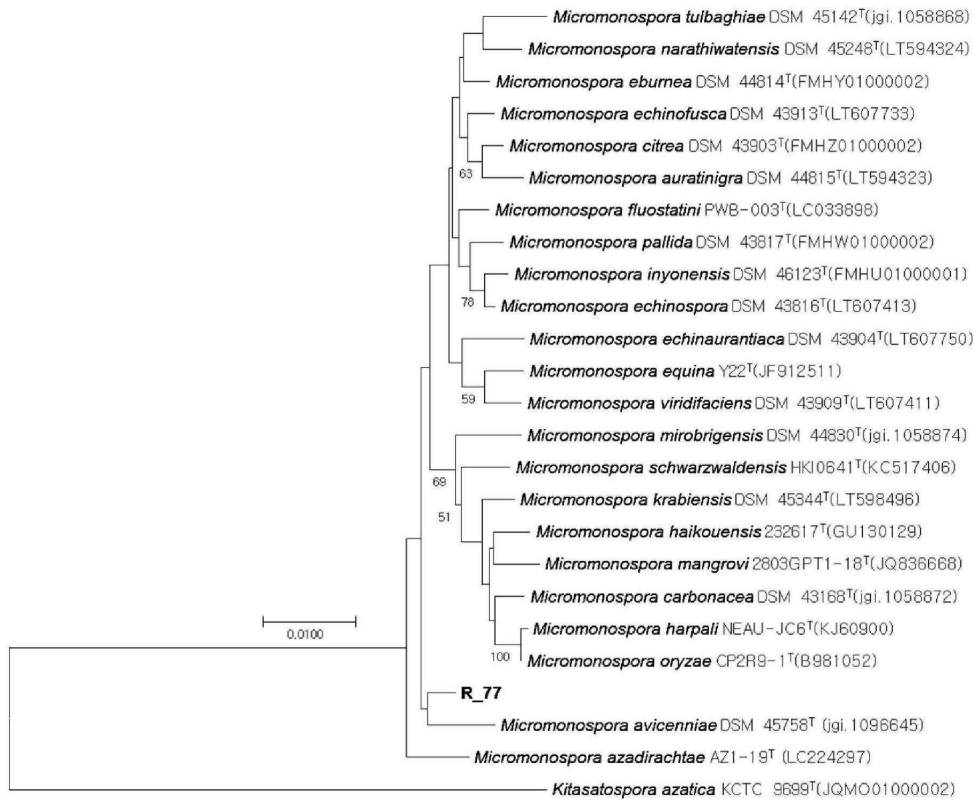
수탁일자 : 20200701

도면

도면1



도면2



도면3

		ISP 2	ISP 7	SCA	
그람 양성 세균	<i>M. luteus</i>	4	3	4	
	<i>S. aureus</i>	4	4	4	
	<i>C. diphtheriae</i>	4	3	4	
	<i>B. subtilis</i>	4	2	4	
그람 음성 세균	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	
	<i>S. enterica</i>	-	-	-	
	<i>S. marcescens</i>	-	-	-	
	<i>E. coli</i>	-	-	-	
	<i>E. faecalis</i>	4	4	4	
	<i>E. cloacae</i>	-	-	-	
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	
효모균	<i>C. krusei</i>	4	3	4	
	<i>C. albicans</i>	4	3	4	
	<i>S. cerevisiae</i>	4	-	-	
사상성 진균	<i>AG-2-1</i>	-	-	-	
	<i>S. minor</i>	-	-	-	
	<i>C. acutatum</i>	-	1	1	
	<i>P. albocoremium</i>	-	-	-	
	<i>A. panax</i>	-	-	-	
	<i>S. lycopersici</i>	-	-	-	
Color	-	w	1~4mm	5~9mm	>10mm
Inhibition zone (mm)	0	1	2	3	4

도면4

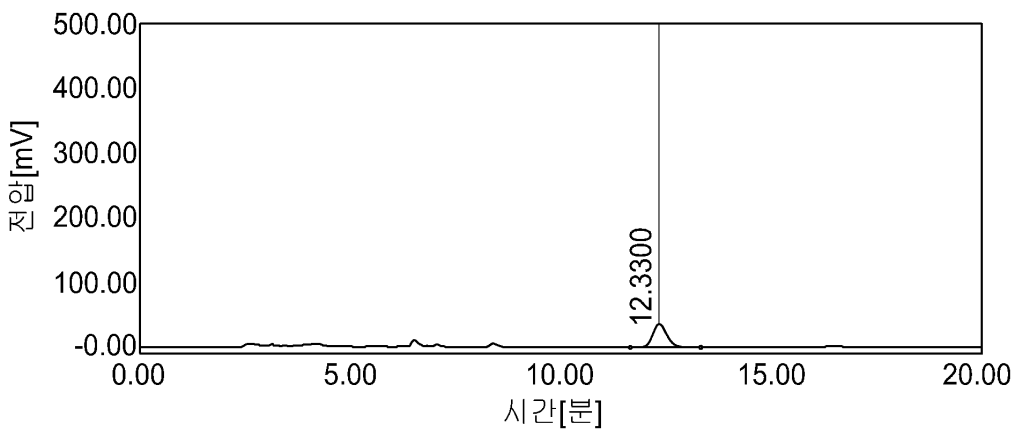
(A)



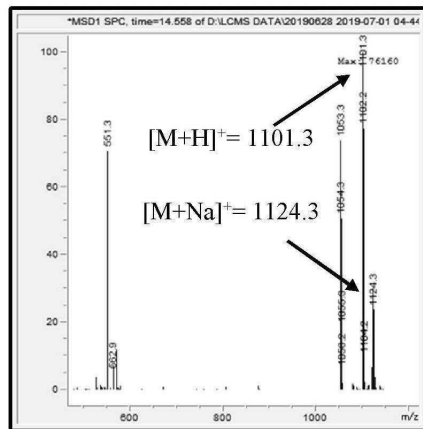
(B)



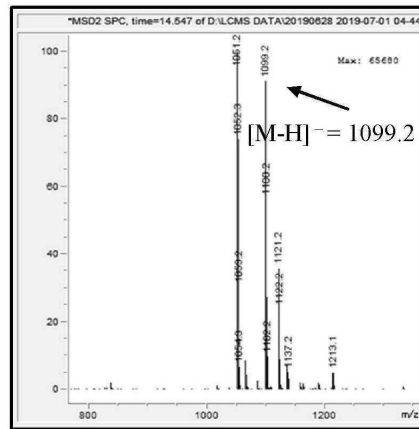
도면5



도면6

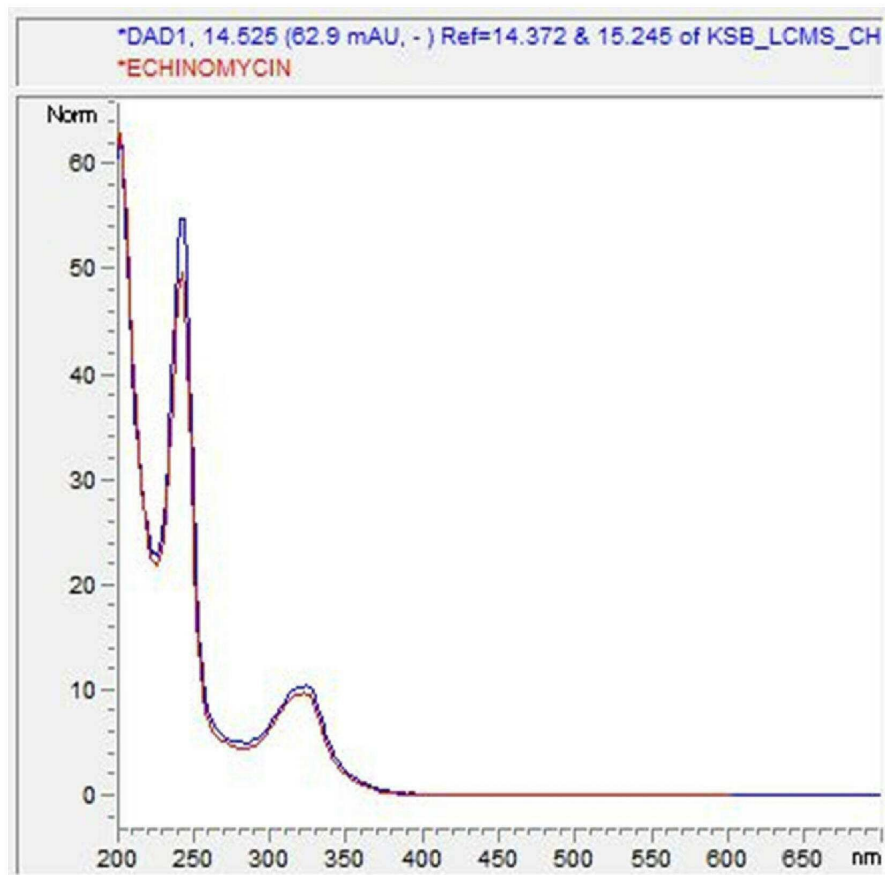


Positive ion mass spectrum

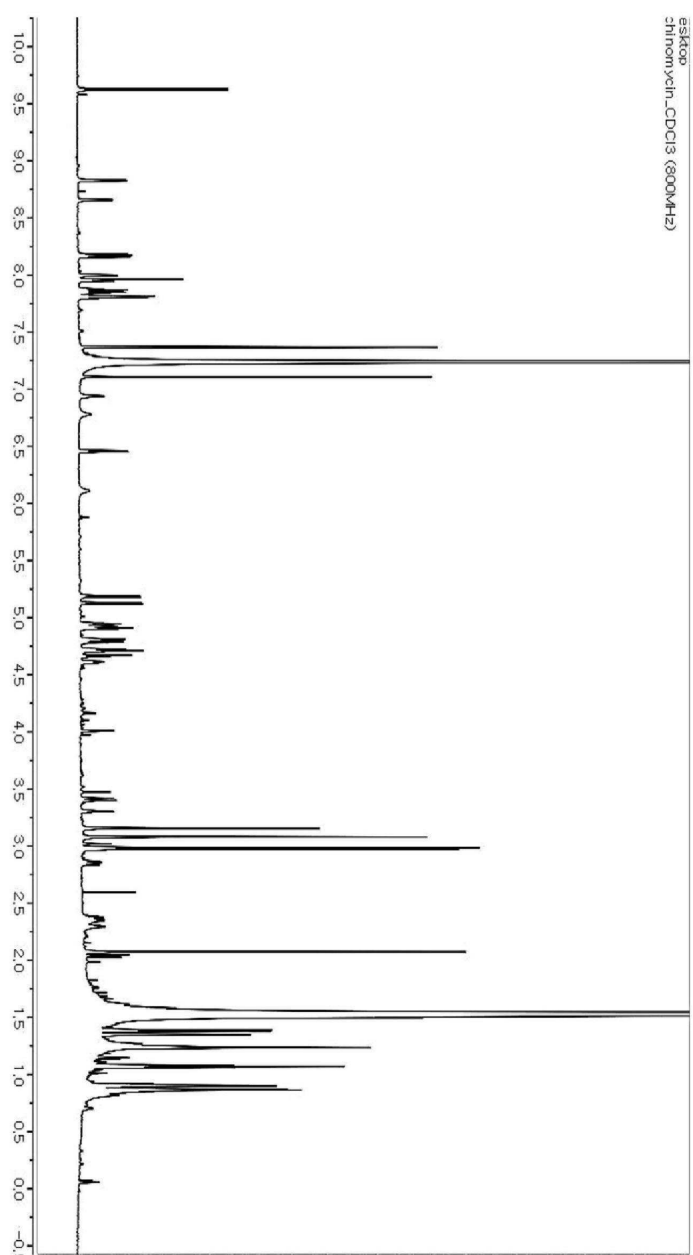


Negative ion mass spectrum

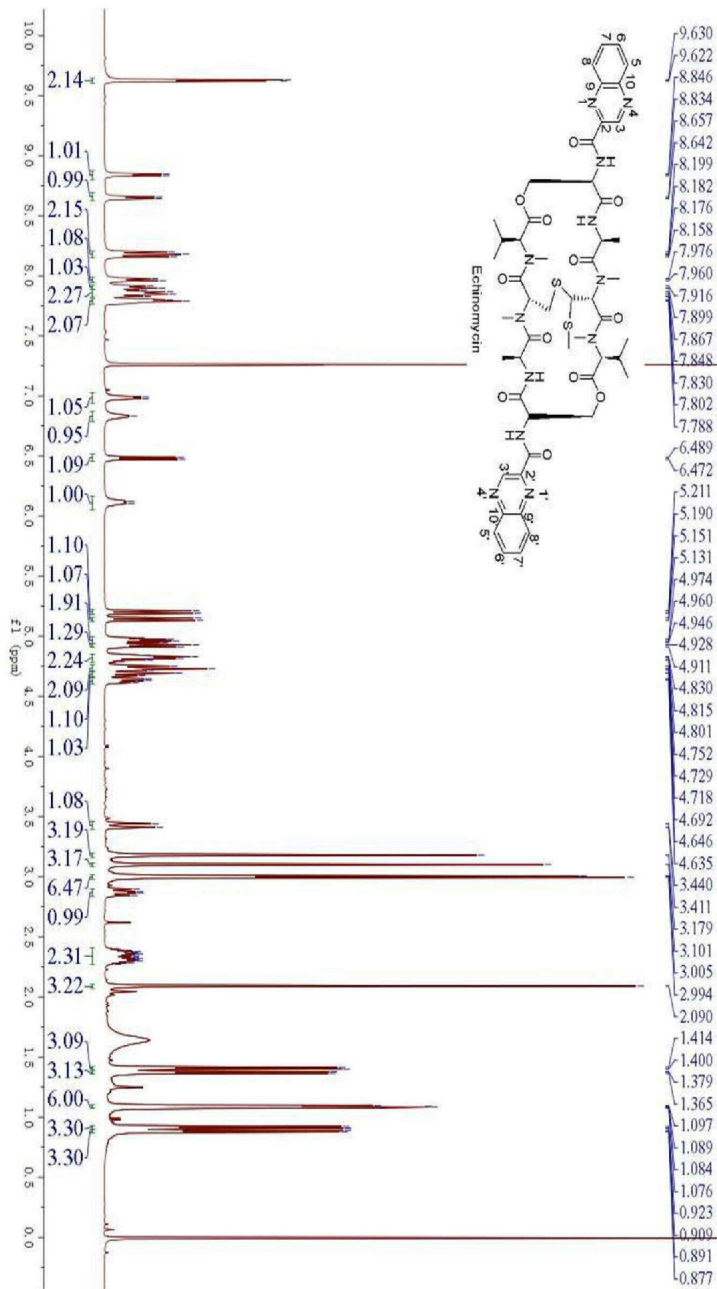
도면7



도면8



도면9



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 4

【변경전】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 기탁번호가 KCTC14227BP인 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물

【변경후】

제1항 또는 제3항의 기탁번호가 KCTC14227BP인 마이크로모노스포라 속 (*Micromonospora* sp.) R_77 균주 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물