



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0040633
(43) 공개일자 2020년04월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12P 17/06 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
C12P 17/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0120796

(22) 출원일자 2018년10월10일

심사청구일자 2018년10월10일

(71) 출원인

국립해양생물자원관

충청남도 서천군 장항읍 장산로101번길 75

(72) 발명자

최그레이스

전라북도 군산시 계산로 90, 현대엠코타운 102동 902호

이정민

전라북도 군산시 미장남로 10 칸타빌 110동 101호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신진만

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 저미시딘 A 및 저미시딘 B를 생산하는 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주, 동 균주의 배양방법, 및 동 균주를 이용한 저미시딘 A 및 저미시딘 B의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 저미시딘 A 및 저미시딘 B를 생산하는 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주, 동 균주의 배양방법, 및 동 균주를 이용한 저미시딘 A 및 저미시딘 B의 생산방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12R 1/465 (2013.01)

(72) 발명자

임미진

강원도 강릉시 사천면 동해대로 3735

남상집

경기도 광명시 하안로 320 하안주공10단지아파트
1012동 607호

류민지

서울특별시 송파구 올림픽로 99 잠실엘스아파트
121동 1202호

명세서

청구범위

청구항 1

저미시딘 A 또는 저미시딘 B를 생산하는 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주 (KFCC11793P).

청구항 2

스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주(KFCC11793P)를 고체 배지에서 1차 배양한 이후 이로부터 생성된 콜로니를 액체 배지에 접종하여 대량으로 액체 배양하는 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주(KFCC11793P)의 배양방법.

청구항 3

스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주 (KFCC11793P)를 배양하고, 배양물로부터 항산화활성이 있는 저미시딘 A 또는 저미시딘 B를 얻는 것을 특징으로 하는 항산화물질의 생산방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

저미시딘 A 또는 저미시딘 B는 상기 배양물을 유기용매로 추출하여 얻어진 추출물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 항산화물질의 생산방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 유기용매는 초산에틸인 것을 특징으로 하는 항산화물질의 생산방법.

청구항 6

제 1항의 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주(KFCC11793P)를 액체 배양한 배양액에 유기용매를 가하여 추출하는 단계;

상기 얻어진 추출물을 크로마토그래피하여 분획물을 얻는 단계; 및

상기 분획물을 고성능 액체 컬럼 크로마토그래피로 분리·정제하는 단계를 포함하는 항산화물질의 정제방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 유기용매는 초산에틸인 것을 특징으로 하는 항산화물질의 생산방법.

청구항 8

제 6항에 있어서,

스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주(KFCC11793P)를 액체 배양한 배양액에 초산에틸 유기용매를 가하여 추출하는 단계;

상기 얻어진 추출물을 20 내지 100%의 메탄올/물 혼합 용액을 이용하여 C-18 역상 오픈 컬럼 크로마토그래피하여 분획물을 얻는 단계; 및

상기 분획물을 아세토니트릴 : H₂O = 30 : 70 용액으로 고성능 액체 컬럼 크로마토그래피로 분리·정제하는 단계를 포함하는 항산화물질의 정제방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 저미시딘 A 및 저미시딘 B를 생산하는 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주, 동 균주의 배양방법 및 동 균주를 이용한 저미시딘 A 및 저미시딘 B의 생산방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 해양퇴적토로부터 분리되어 항산화능이 우수한 저미시딘 A 및 저미시딘 B를 생산하는 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주, 동 균주의 배양방법 및 동 균주를 이용한 저미시딘 A 및 저미시딘 B의 대량 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 식품의 산화로 생성되는 과산화물이 단백질, 탄수화물, 비타민, 색소, 향미 성분 등의 다른 성분과 결합하여 결국 변질을 초래하게 되며, 또 여러 가지 과산화물은 효소, 단백질, 세포막, 세포기관 등에 영향을 주어 생체세포에도 손상을 주게 된다.
- [0003] 항산화제는 식품 등에 직접 첨가하여 유지의 산화과정의 초기에서 생성되는 유리기를 제거하거나 불활성화시킴으로써 유지의 산화를 억제하거나 중식시켜 유지 및 그 관련제품의 산화를 방지할 수 있게 된다. 그리고 항산화제는 직접 유지 및 관련식품이나 의약품에 첨가하여 이용하는 외에도 유지를 함유하는 식품의 포장지에 처리하면 포장된 제품의 저장성이 상당히 많이 연장되는 것으로 보고되고 있다.
- [0004] 현재 가장 많이 쓰이고 있는 항산화제는 합성항산화제인 BHA, BHT, TBHQ, PG 등과 천연항산화제인 토코페롤(tocopherol) 등이 있다. 이들 중 천연항산화제는 합성항산화제와 비교할 때 항산화 효과가 떨어지고 가격이 너무 비싸기 때문에 그 이용성이 크게 제한을 받고 있으며, 현재 주로 쓰이고 있는 합성항산화제는 페놀계 물질로서 인체에 대한 안전성이 문제가 되어 FDA 등에서의 사용금지 품목이 증가하고 있는 실정이다. 그래서 독성이 없고 효과가 큰 새로운 항산화제의 개발이 진행되고 있다. 그 결과 여러 가지 식물을 대상으로 많은 항산화성 물질이 연구 보고되었으나 이들의 연구는 각종 식물 체내의 항산화성 물질의 존재여부와 성질조사에 한정되고 있는 실정이다.
- [0005] 한편 미생물의 항산화성 물질에 관한 연구는 1957년 Forbes 등이 효모로부터 항산화성 물질을 분리한 것이 처음이며, Smith 등은 *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus* sp., *Bacillus cereus* 등의 벤젠 추출물 등에서 항산화성 물질의 존재를 확인하였다. 그 후 Zaika와 Smith는 *Aspergillus niger*, *Thamnidium elegans*, *Candida lipolytica* 등을 대상으로 Jessy 등은 육상 및 해양 유래 Actinomycetes에서 항산화 효과를 보이는 물질을 분리하고 특성 등을 연구하였다. 그러나 이러한 보고들은 생산 미생물의 분포 및 분리 선별 단계에 머물고 있는 실정이어서 안전성이 높고 가격이 저렴한 천연항산화제의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 상기한 바와 같은 종래기술이 가지는 문제를 해결하기 위해 안출된 것으로, 그 목적은 안전성이 높고 가격이 저렴하며, 항산화 효과가 우수한 새로운 천연 항산화제인 저미시딘 A 및 저미시딘 B를 생산하는 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주, 동 균주의 배양방법 및 동 균주를 이용한 저미시딘 A 및 저미시딘 B의 생산방법을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기한 바와 같은 본 발명의 기술적 과제는 다음과 같은 수단에 의해 달성되어진다.
- [0008] (1) 저미시딘 A 또는 저미시딘 B를 생산하는 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주(KFCC11793P).
- [0009] (2) 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주(KFCC11793P)를 고체 배지에서 1차 배양한 이후 이로부터 생성된 콜로니를 액체 배지에 접종하여 대량으로 액체 배양하는 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주(KFCC11793P)의 배양방법.
- [0010] (3) 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주 (KFCC11793P)를 배양하고, 배양물로부터

터 항산화활성이 있는 저미시딘 A 또는 저미시딘 B를 얻는 것을 특징으로 하는 항산화물질의 생산방법.

- [0011] (4) 상기 (3)에 있어서,
- [0012] 저미시딘 A 또는 저미시딘 B는 상기 배양물을 유기용매로 추출하여 얻어진 추출물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 항산화물질의 생산방법.
- [0013] (5) 상기 (4)에 있어서,
- [0014] 상기 유기용매는 초산에틸인 것을 특징으로 하는 항산화물질의 생산방법.
- [0015] (6) 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주(KFCC11793P)를 액체 배양한 배양액에 유기용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0016] 상기 얻어진 추출물을 크로마토그래피하여 분획물을 얻는 단계; 및
- [0017] 상기 분획물을 고성능 액체 컬럼 크로마토그래피로 분리·정제하는 단계를 포함하는 항산화물질의 정제방법.
- [0018] (7) 상기 (6)에 있어서,
- [0019] 상기 유기용매는 초산에틸인 것을 특징으로 하는 항산화물질의 생산방법.
- [0020] (8) 상기 (6)에 있어서,
- [0021] 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주(KFCC11793P)를 액체 배양한 배양액에 초산에틸 유기용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0022] 상기 얻어진 추출물을 20 내지 100%의 메탄올/물 혼합 용액을 이용하여 C-18 역상 오픈 컬럼 크로마토그래피하여 분획물을 얻는 단계; 및
- [0023] 상기 분획물을 아세토니트릴 : H₂O = 30 : 70 용액으로 고성능 액체 컬럼 크로마토그래피로 분리·정제하는 단계를 포함하는 항산화물질의 정제방법.

발명의 효과

- [0024] 상기와 같이 본 발명에 의하면, 안전성이 높고 가격이 저렴하며, 항산화 효과가 우수한 새로운 천연 항산화용 조성물을 제공함으로써, 식품, 화장품, 기타 관련 산업의 확대 및 국민건강에 기여할 수 있다.

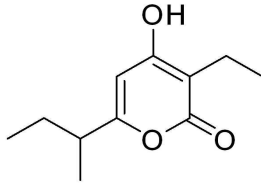
도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 해양퇴적토로부터 분리한 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주의 Marine 고체배지에서의 형태를 나타내는 사진이고,
- 도 2는 배양한 SCS525 균주의 전체 추출물 분획 후, 그 중 항산화효과가 가장 뛰어난 분획 3번제의 크로마토그램 (UV 254, 280 nm 피크를 나타냄)으로, 빨간색 화살표는 각각 저미시딘 B (Germicidin B)와 저미시딘 A(Germicidin A)를 가리킨다.
- 도 3은 분리정제된 화합물의 동정실험결과.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

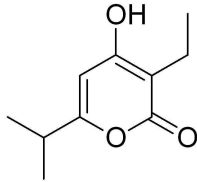
- [0026] 본 발명에 따른 균주는 저미시딘 A 또는 저미시딘 B를 생산하는 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주이다.
- [0027] 상기 본 발명에 따른 SCS525 균주가 생산하는 저미시딘 A(Germicidin A) 및 저미시딘 B(Germicidin B)는 각각 하기 화학식 1과 화학식 2로 표시되는 화합물이다.

[0028] [화학식 1]



[0029]

[0030] [화학식 2]



[0031]

[0032] 본 발명의 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주는 해양퇴적토로부터 분리된 것으로, 보다 구체적으로는 충청남도 서천군 장항읍 송림리 송림해수욕장 인근에서 해양퇴적토를 채취한 뒤, 클린벤치에서 건조 후 상기 건조물을 멸균된 해수에 현탁하여 1/20으로 희석한 후 마린 브로스 (Marine broth) 고체배지에 접종하고, 27℃에서 배양하면서 생성된 단일 균주를 마린 브로스 (Marine broth) 고체배지에 다시 접종하여 순수한 균주를 분리 및 선별하여 얻은 것이다.

[0033] 이와 같이 분리된 본 발명의 SCS525 균주는 전형적인 스트렙토마이세스 속에 속하는 균주의 형태적 양상이 관찰되었다(도 1 참조). 상기 SCS525 균주는 서열번호 1에 나타낸 바와 같은 16S rRNA 유전자 염기서열을 가지며 이차대사산물로서 화학식 1과 2의 저미시딘 A와 B를 분비한다. 상기 균주 SCS525는 한국미생물보존센터에 2018년 9월 10일자로 기탁하여, 수탁번호 KFCC11793P를 부여받았다.

[0034] 또한, 본 발명에서는 상기 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주를 고체 배지에서 1차 배양한 이후 이로부터 생성된 콜로니를 액체 배지에 접종하여 대량으로 액체 배양하는 것이 가능하다.

[0035] 본 발명에 의하면, 상기 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주의 이차대사산물 중 항산화 효능을 갖는 물질이 있음을 확인하였고(시험예 1 내지 2 참조), 이러한 유용한 이차대사 산물은 배양 후 약 4일째부터 생산되는 것으로 나타났다.

[0036] 따라서, 항산화용 조성물의 유효 성분으로 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주 뿐만 아니라 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주의 배양물, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 유기용매 추출물도 유효성분으로 사용할 수 있다.

[0037] 유용한 이차대사산물의 생산에 최적 조건을 제공하기 위하여, 배양 배지는 Marine broth (BD) 등일 수 있다. 상기 Marine broth 배지 형태는 고체배지와 액체배지 모두 가능하며, 바람직하게는 액체배지일 수 있다. 배양 기간은 유효한 이차대사 산물의 생산이 활발한 약 4일 이상, 바람직하게는 4 내지 20일, 보다 바람직하게는 6 내지 15일로 하는 것이 좋다.

[0038] 본 발명에서 상기 건조물과 농축물은 배양물을 통상적인 방법으로 건조 또는 농축하여 얻어진 것을 의미한다.

[0039] 상기 유기용매 추출물은 SCS525 균주의 배양물을 초산에틸로 추출하여 얻어진 추출물이다.

[0040] 상기 추출은 초임계추출, 고압추출 또는 초음파추출법 등의 추출장치를 이용한 방법, 또는 셀라이트 또는 폴리 스틸렌 또는 폴리아마드 흡착수지를 이용하는 방법으로 대체 가능하나 이에 한정하지 않는다. 추출 시 용매를 배양액 분량의 1 내지 3 부피 배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 상온에서 추출하는 것이 바람직하다. 추출 회수는 1 내지 3회인 것이 바람직하며, 감압건조는 회전진공농축기 (Rotary Vacuum Evaporator)를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 감압건조 시 온도는 20 ~ 40℃인 것이 바람직하고 30℃인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0041] 상기 추출물의 물/메탄올 분획물은 상기 유기용매 추출물을 메탄올 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100% 용액으로 추가로 분획하여 얻어진 소분획물일 수 있다. 상기 분획물 및/또는 소분획물은 화학식 1과 2의 화합물을 비롯하여 유용한 이차대사산물을 함유하여 우수한 항산화 효과를 나타낼 수 있다.

- [0042] 또한, 본 발명에서는 상기 SCS525 균주로부터 분리된 화학식 1의 저미시딘 A(Germicidin A), 화학식 2의 저미시딘 B(Germicidin B)가 제공된다. 이들 화합물은 모두 우수한 항산화 효능이 있는 것으로 나타났다.
- [0043] 상기 유효성분으로 사용되는 화학식 1의 저미시딘 A(Germicidin A)와 화학식 2 저미시딘 B(Germicidin B)는 그 자체, 또는 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 염인 유리산에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다.
- [0044] 상기 SCS525 균주 및/또는 이로부터 분리된 상기 화합식 1과 화합식 2로 표시된 화합물, 혹은 이의 염은 적은 농도로 강한 항산화 효능을 가져 폭넓은 항산화제로 사용될 수 있다는 이점을 갖는다. 상기 SCS525 균주 배양물의 초산에틸 추출물, 이의 분획물, 이로부터 정제된 화합물 1과 화합물 2는 ABTS 실험 및 DPPH 실험에서 강한 항산화 효능을 보였다.
- [0045] 본 발명은 또한, SCS525 균주로부터 상기 화학식 1과 화학식 2의 화합물들을 분리 정제하여 제조하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 다음의 단계를 포함할 수 있다:
- [0046] 1) 상기 SCS525 균주를 액체 배양한 배양액에 초산에틸 유기용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0047] 2) 상기 얻어진 추출물을 20 내지 100%의 메탄올/물 혼합 용액을 이용하여 C-18 역상 오픈 컬럼 크로마토그래피하여 분획물을 얻는 단계;
- [0048] 3) 상기 분획물을 Acetonitrile : H₂O = 30 : 70 용액으로 고성능 액체 컬럼 크로마토그래피로 분리·정제 하는 단계.
- [0049] 상기 제조방법에 있어서, 단계 1)의 액체 배양은 Marine broth 액체배지를 사용하여 균주 콜로니 2-3개당 액체 배지 20 내지 30 ml의 비율로 접종하여 수행하는 것이 좋다.
- [0050] 상기 배양액의 유기용매 추출 시 용매를 배양액 분량의 1 내지 3 부피배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 약 2 부피 배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 감압건조는 회전진공농축기 (Rotary Vacuum Evaporator)를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 감압건조 시 온도는 20 ~ 40℃인 것이 바람직하고 30℃인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0051] 단계 2) 또는 단계 3)의 컬럼 크로마토그래피는 실리카겔, 세파텍스, RP-18, RP-8, RP-4, 폴리아미드, 도요필 (Toyopearl) 및 XAD 수지로 이루어진 그룹으로부터 선택된 충전제를 이용한 컬럼 크로마토그래피될 수 있다. 컬럼 크로마토그래피는 필요에 따라 적절한 충전제를 선택하여 수차례 실시할 수 있으며, 용매로 클로로포름 (CHCl₃)-메탄올, 초산에틸 (ethyl acetate)-메탄올, 염화메틸렌 (dichloromethane)-메탄올, 메탄올-물 또는 아세토나이트릴-물을 이용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0052] 본 발명의 구체예에서, 용리 조건으로 물과 메탄올을 사용하였으며, 20% 메탄올/80% 물로 시작하여 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100% 메탄올의 함량을 증가시켰다. 이로부터 얻어진 분획물을 C-18을 이용한 컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 주성분을 분석한 결과 50% 메탄올/50% 물 분획물에서 2종의 화합물이 확인되었다. 상기 분획물에 추가적으로 50% 메탄올/50% 물 분획물의 30% 아세토나이트릴/70% 물 조건 및 분당 2 ml의 유속의 용리조건으로, 10 mm×250 mm의 RP-18 컬럼을 이용한 역상 액체 크로마토그래피법을 통해 정제하였으며 머무름 시간 26분에 상기 화학식 2로 표시되는 저미시딘 B(Germicidin B)와 머무름 시간 42분에 상기 화학식 1로 표시되는 저미시딘 A(Germicidin A)를 각각 수득하였다.
- [0053] 상기 분리한 화합물들은 MS 및 핵분광기를 이용하여 화합물의 구조를 분석하여 화학구조를 동정하였으며, 화합물 2의 저미시딘 B(Germicidin B)는 분자량 182이며, 분자식이 C₁₀H₁₄O₃인 무정형 흰색 분말상이고, 화합물 1의 저미시딘 A(Germicidin A)는 분자량 196이며, 분자식이 C₁₁H₁₆O₃인 무정형 흰색 분말상의 물질인 것을 확인하였다.
- [0054] 상기 본 발명에 따른 항산화용 조성물은 식품조성물, 약제학적 조성물 내지 화장품 조성물일 수 있다.
- [0055] 상기 식품조성물로서의 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있으며, 저미시딘 A 또는 저미시딘 혹은 이의 염은 바람직하게는 0.01~10.0중량% 포함된다.
- [0056] 본 발명에서 사용될 수 있는 식품보조첨가제는 당업계에 통상적인 식품첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서, 상기

추출물을 외에 첨가되는 성분에 특별한 제한은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예로는 단당류, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 이당류, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 다당류, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등; 과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 솔비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용하는 것도 좋다.

[0057] 상기 외에 본 발명의 식품조성물은 다양한 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0058] 그밖에 본 발명의 식품조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 특별히 한정되지는 않지만 본 발명의 식품조성물 100 중량부에 대하여 0 내지 약 10 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0059] 본 발명의 상기 항산화용 조성물이 약제학적 조성물인 경우, 저미시딘 A 또는 저미시딘 혹은 이의 염은 바람직하게는 0.01~10.0중량% 포함되며, 동 조성물은 목적하는 바에 따라 비경구 투여하거나 경구 투여할 수 있으며, 하루에 체중 1kg 당 0.001 내지 5g의 양을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여 방법, 흡수율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명의 상기 항산화용 조성물이 화장료 조성물인 경우 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0061] 상기 저미시딘 A 또는 저미시딘 혹은 이의 염은 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 각각 0.01 내지 10.0 중량%의 범위내에서 첨가하는 것이 바람직하다.

[0062] 이하 본 발명의 내용을 실시예를 참조하여 보다 상세하게 설명하고자 하나 이들 실시예는 본 발명의 내용을 이해하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명의 권리범위가 한정되는 것으로 해석되어져서는 아니된다.

[0063] [실시예 1] 해양퇴적토로부터 균주 탐색 및 선별

[0064] 2016년 5월 2일 충청남도 서천군 송림리 송림해수욕장 인근 36° 00' 42.7" N 126° 39' 41.8" E 에서 퇴적토를 채집하였다. 채집된 퇴적토는 클린벤치에서 건조 후 상기 건조물을 멸균된 해수에 현탁하여 1/20으로 희석한 후 마린 브로스 (Marine broth) 고체배지에 접종하고, 27℃에서 배양하면서 생성된 단일 균주를 마린 브로스 (Marine broth) 고체배지에 다시 접종하여 순수한 균주를 분리 및 선별하였다. 순수 분리된 SCS525 균주는 도 1과 같이 스트렙토마이세스 속에 속하는 균주들과 같은 형태적 양상이 관찰되었다. 균주의 종 동정을 위해 마린브로스 (Marine broth) 액체배지에서 4일 동안 27℃에서 배양된 균주 1ml을 취하여 "Tissue Genomic DNA Isolation kit" (Cosmogenetech co, Ltd., Seoul, South Korea)를 이용하여 제조회사 프로토콜에 의하여 genomic DNA를 추출하였다. 종 분석을 위해 16S rRNA 유전자 증폭을 위해 27F 및 1492R 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 "PCR purification kit" (Cosmogenetech co, Ltd., Seoul, South Korea)을 이용하여 정제 후, capillary electrophoresis 기계 (Applied Biosystems 3730XL)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 이렇게 얻어진 SCS525균주로부터 얻어진 16S rRNA 유전자 염기서열은 GenBank/EMBL/DBJ 데이터베이스의 BLAST 서치를 활용하여 이전에 보고된 균주들의 정보와 비교하였다. 그 결과 SCS525 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열의 경우, *Streptomyces diastaticus*, *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus*, *Streptomyces fradiae* 균주들과 99.9% 상동성을 보임에 따라 본 SCS525 균주의 경우 *Streptomyces* 속에 속하는 균주로 판단된다.

[0065] [실시 예 2] 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCS525 균주의 액체 대량배양

[0066] SCS525 20L를 각각 2.5-L Ultra Yield Flask에 1L SYP.s.w 배지 (1L의 증류수에 수용성 전분 10 g/L, 효모 (yeast) 2 g/L, 펩톤 4 g/L, 소금 (sea salt) 35 g/L)에 25 °C, 150 rpm으로 셰이킹하며 7일 동안 배양 후,

20L의 초산에틸로 추출하여 735 mg의 추출물을 얻었다.

[실시 예 3] 화합물들의 분리정제

EtOAc 추출물 (735 mg)은 H₂O와 MeOH의 20~100% MeOH의 단계적 구배에 따르는 C-18 실리카를 이용한 역상 칼럼 크로마토그래피로 분획하였다. 그 중 50% MeOH로 분획한 세 번째 분획 (101 mg)을 아세트나이트릴 : 물 = 30 : 70 의 조건으로 역상 HPLC (Phenomex C18 250x10.0mm, 5 m, 2.0 ml/min, UV = 280 nm)를 이용해 저미시딘 B (6.5 mg)와 저미시딘 A (6.4 mg)를 각각 26분, 42분에 분리하였다[도 3a, 도 3b참조].

[시험예 1] 항산화 효능 확인을 위한 ABTS 실험

항산화 효과 실험을 위해 대표적인 ABTS (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothia zoline-6-sulphonic acid) 및 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거활성을 측정하였다.

ABTS 라디칼 소거활성은 Roberta (1999)의 방법에 준하여 수행하였다. 실험에 앞서 7mM ABTS 2.5 ml와 2.45mM potassium peroxodisulfate 2.5 ml를 섞고 암실의 냉장고에서 12~16시간 인큐베이션한 뒤 EtOH(에탄올)로 희석 해서 흡광도 734 nm에서 0.700±0.020 나오도록 시험용액을 희석하였다. 각 시료를 DMSO(dimethyl sulfoxide)을 사용하여 농도별로 맞추고 96 well-plate를 이용하여 각 농도별 100 µl를 넣고 앞서 만든 ABTS 시약 100 µl를 넣어 총 부피 200 µl로 15분간 상온의 암실에서 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

ABTS 라디칼 소거활성 (%) = [1-(대조구흡광도-시료흡광도)/대조구흡광도]*100

ABTS 라디칼 소거능 결과는 다음과 같다.

- 군주 SCS525 총 조추출물의 ABTS 결과

ABTS 라디칼 소거능 결과에서 군주 SCS525 배양액의 총 조추출물에서 IC₅₀ 값이 0.002 mg/ml, 양성대조군으로 쓰인 아스코빅산 0.017 mg/ml 농도에서 IC₅₀ 값으로 관찰되었다.

- 군주 SCS525 배양액 조추출물의 분획을 통해 washing fraction 포함 10개 분획물의 ABTS 결과

표 1

NO.	시료번호	IC ₅₀ value (mg/ml)
1	SCS525F1	0.045±0.004
2	SCS525F2	0.038±0.000
3	SCS525F3	0.012±0.000
4	SCS525F4	0.015±0.000
5	SCS525F5	0.017±0.000
6	SCS525F6	0.032±0.001
7	SCS525F7	0.068±0.001
8	SCS525W1	0.051±0.000
9	SCS525W2	0.055±0.001
10	SCS525W3	0.101±0.001

ABTS 결과 SCS525F3 (분획물 3) 시료에서 가장 낮은 농도 0.012 mg/ml에서 IC₅₀ 값을 보였다. 이에 본 발명자들은 분획물 3번 시료에서 항산화 효능을 보이는 이차대사물질을 분리하기 위하여 분획물 3을 정제하였다. - 분획물 3번을 정제하여 얻은 총 12개 피크에 대한 활성

표 2

NO.	시료번호	IC ₅₀ value (mg/ml)
1	SCS525F3-A	0.020±0.001
2	SCS525F3-A2	0.043±0.000
3	SCS525F3-B	0.085±0.000
4	SCS525F3-C	0.193±0.001
5	SCS525F3-D	0.006±0.000
6	SCS525F3-21	0.074±0.001

7	SCS525F3-22	0.056±0.001
8	SCS525F3-23	0.063±0.001
9	SCS525F3-(4-7)	0.071±0.002
10	SCS525F3-(7-9)	0.021±0.002
11	SCS525F3-(10-15)	0.433±0.002
12	SCS525F3-(15-20)	0.059±0.001

[0080] ABTS 결과 SCS525F3-A와 SCS525F3-D 시료에서 각각 0.020, 0.006 mg/ml 농도로 IC₅₀ 값을 보였다. 이에 본 발명자들은 정제된 SCS525F3-A와 SCS525F3-D 이차대사물질의 구조를 분석한 결과 저미시딘 B 및 저미시딘 A로 동정되었다.

[0081] [시험예 2] 항산화 효능 확인을 위한 DPPH 실험

[0082] DPPH 라디칼 소거활성은 Blois (1985)의 방법에 준하여 수행하였다. 각 시료를 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 사용하여 농도별로 맞추고 96 well-plate를 이용하여 메탄올에 용해시킨 5.9 mg/100 ml 농도의 DPPH 용액 100 μ l에 각 시료 100 μ l를 넣고 혼합하여 30분간 상온의 암실에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH 라디칼 소거활성은 다음과 같이 계산하였다.

[0083] DPPH 라디칼 소거활성(%) = [1-(대조구흡광도-시료흡광도)/대조구흡광도]*100

[0084] DPPH 라디칼 소거능 결과는 다음과 같다.

[0085] - 균주 SCS525 총 조추출물의 DPPH 결과

[0086] DPPH 라디칼 소거능 결과에서 균주 SCS525 배양액의 총 조추출물에서 IC₅₀ 값이 0.516 mg/ml, 양성대조군으로 쓰인 아스코빅산 0.007 mg/ml 농도에서 IC₅₀ 값으로 관찰되었다.

[0087] - 균주 SCS525 배양액 조추출물의 분획을 통해 washing fraction 포함 10개 분획물의 DPPH 결과

표 3

[0088]

NO.	시료번호	IC ₅₀ value (mg/ml)
1	SCS525F1	0.621±0.010
2	SCS525F2	0.373±0.003
3	SCS525F3	0.305±0.004
4	SCS525F4	0.318±0.002
5	SCS525F5	0.327±0.013
6	SCS525F6	0.546±0.017
7	SCS525F7	>2.5
8	SCS525W1	>2.5
9	SCS525W2	>2.5
10	SCS525W3	>2.5

[0089] DPPH 결과 SCS525F3 (분획물 3) 시료에서 가장 낮은 농도 0.305 mg/ml에서 IC₅₀ 값을 보였다. 이에 본 발명자들은 분획물 3번 시료에서 항산화 효능을 보이는 이차대사물질을 분리하기 위하여 분획물 3을 정제하였다. - 분획물 3번을 정제하여 얻은 총 12개 피크에 대한 활성

표 4

[0090]

NO.	시료번호	IC ₅₀ value (mg/ml)
1	SCS525F3-A	1.659±0.163
2	SCS525F3-A2	>2.5
3	SCS525F3-B	1.454±0.021
4	SCS525F3-C	1.181±0.035
5	SCS525F3-D	0.707±0.017
6	SCS525F3-21	0.730±0.013
7	SCS525F3-22	0.476±0.001

8	SCS525F3-23	0.607 ± 0.015
9	SCS525F3-(4-7)	0.351 ± 0.001
10	SCS525F3-(7-9)	0.208 ± 0.001
11	SCS525F3-(10-15)	>2.5
12	SCS525F3-(15-20)	0.934 ± 0.019

[0091] DPPH 결과 SCS525F3-A와 SCS525F3-D 시료에서 각각 1.659, 0.707 mg/ml 농도로 IC_{50} 값을 보였다. ABTS 결과와 항산화 효능의 결과의 차이를 보였지만, 거의 모든 시료는 2 mg/ml 농도 이하에서 IC_{50} 값을 보였다.

[0092]

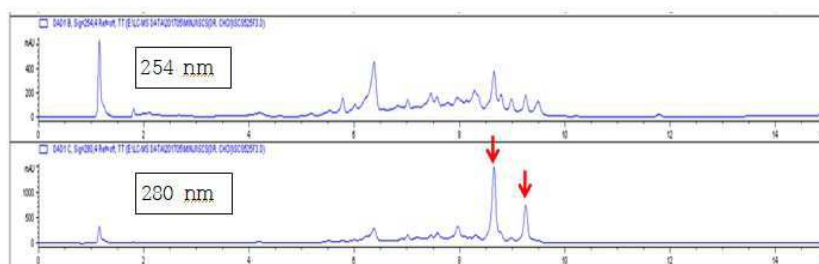
[0093] 상기와 같이, 본 발명의 바람직한 실시 예를 참조하여 설명하였지만 해당 기술 분야의 숙련된 당업자라면 하기의 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

도면

도면1

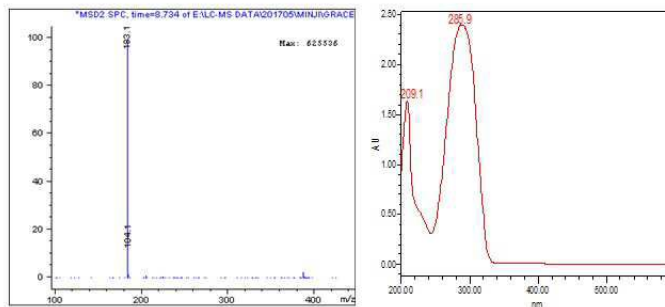
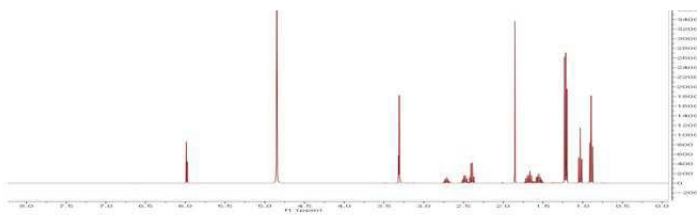


도면2



도면3a

[저미시던 B]

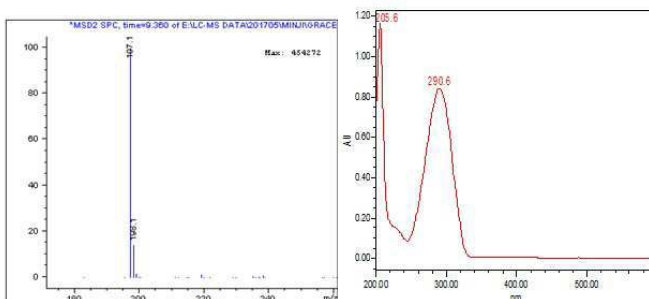
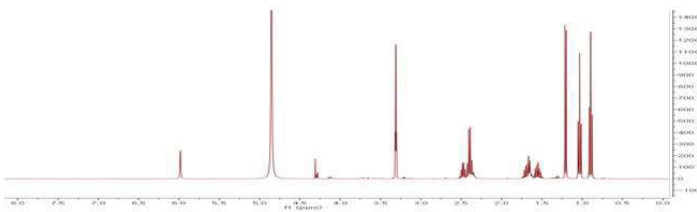


$$[M+H] = 183$$

$$[M] = 182$$

도면3b

[저미시던 A]



$$[M+H] = 197$$

$$[M] = 196$$

서열 목록

<110>	National Marine Biodiversity Institute of Korea	
<120>	Streptomyces diastaticus subsp. ardesiacus SCS525 producing Germicidin A and B, Culturing method, and Preparation method of Germicidin A and B using the same	
<130>	SP0968	
<160>	1	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	1095	
<212>	DNA	
<213>	Streptomyces diastaticus	
<400>	1	
	agctccggcg gtgcaggatg agcccgcggc ctatcagctt gttggtgagg taatggctca	60
	ccaaggcgac gacgggtagc cggcctgaga gggcgaccgg ccacactggg actgagacac	120
	ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatatgtc acaatgggcg aaagcctgat	180
	gcagcgacgc cgcgtgaggg atgacggcct tcgggttgta aacctctttc agcagggaag	240
	aagcgaaagt gacggctact gcagaagaag cgccggctaa ctacgtgccg gcagccgcgg	300
	taatacgtag ggcgcaagcg ttgtccgaa ttattgggcg taaagagctc gtaggcggct	360
	tgtcgcgtcg gttgtgaaag cccggggctt aacccgggt ctgcagtcga tacgggcagg	420
	ctagagttcg gtaggggaga tcggaattcc tgggtgtagc gtgaaatgcg cagatatcag	480
	gaggaacacc ggtggcgaag gcggatctct gggccgatac tgacgtgag gagcgaaagc	540
	gtggggagcg aacaggatta gataccctgg tagtcacgc cgtaaacggt gggcactagg	600
	tgtgggcaac attccacgtt gtccgtgccg cagctaacgc attaagtgc cgcctgggg	660
	agtacggccg caaggctaaa actcaaagga attgacgggg gcccgacaa gcggcggagc	720
	atgtggctta attcgacgca acgcaagaa ccttaccaag gcttgacata caccggaaag	780
	catcagagat ggtgcccc ttgtggtcgg tgtacagtg gtgcatggct gtcgtcagct	840
	cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca acccttgtcc cgtgttgcca	900
	gcaactcttc ggaggttggg gactcacggg agaccgccgg ggtcaactcg gaggaaggtg	960
	gggacgacgt caagtcatca tgccccttat gtcttgggct gcacacgtgc tacaatggcc	1020
	cgggtacaatg agctgcgata ccgcaagtg gagcgaatct caaaaagccg gtctcagttc	1080
	ggattggggt ctgca	1095