(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월02일
(11) 등록번호 10-1467990
(24) 등록일자 2014년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A61K 35/74* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *A61P 31/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0099727
(22) 출원일자 2013년08월22일
심사청구일자 2013년08월22일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110093191 A
KR1020050024873 A
KR1020100054747 A
KR1019990066324 A

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김승범
대전 서구 둔산남로 127, 104동 1007호 (둔산동, 목련아파트)
신영민
경북 김천시 성의1길 6, 1102호 (지좌동, 동부아파트)
한지혜
충청남도 논산시 강경읍 홍교리 계백로 219길 56호
(74) 대리인
이원희

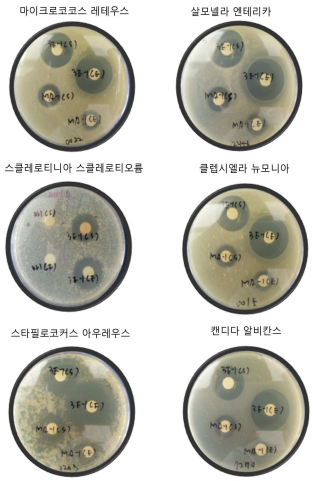
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 및 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 3E-1 균주 및 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 야생 망초(*Conyza canadensis*)로부터 분리한 신규한 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 3E-1 균주 또는 이의 배양액은 유의적인 항균 및 항진균활성을 나타내고, 기존 항생물질로 알려진 트리메소프림(trimethoprim)을 유의적으로 생산하므로, 상기 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 또는 이의 배양액은 항균 또는 항진균용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 013-2010-1-C00025
부처명 한국연구재단
연구관리전문기관 충남대학교
연구사업명 대학교수해외방문연구지원사업
연구과제명 방선균에 의한 항생제내성 병원균의 억제 연구
기 여 율 1/1
주관기관 충남대학교
연구기간 2010.08.16 ~ 2011.08.15

특허청구의 범위

청구항 1

수탁번호 KCTC 12434BP로 기탁된 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 3E-1 균주.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 마이크로코코스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 세라치아 마르세센스(*Serratia marcescens*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스타필로코커스 엔테리카(*Staphylococcus enterica*), 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 파이토프소라 캡사이시 레오니안(*Phytophthora capsici Leonian*) 및 스클레로티니아 스클레로티오륨(*Sclerotinia sclerotiorum*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 세균 또는 진균에 대한 항균 및 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

삭제

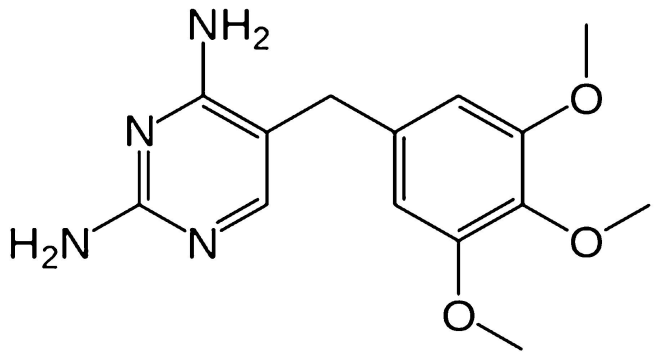
청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주는 하기 [화학식 1]로 표시되는 트리메소프림(trimethoprim)을 생산하는 것을 특징으로 하는 균주:

[화학식 1]



.

청구항 6

수탁번호 KCTC 12434BP로 기탁된 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 마이크로코코스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 세라치아 마르세센스(*Serratia marcescens*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스타필로코커스 엔테리카(*Staphylococcus enterica*), 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 파이토프소라 캡사이시 레오니안(*Phytophthora capsici Leonian*) 및 스클레로티니아 스클레로티오륨(*Sclerotinia sclerotiorum*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하

나의 세균 또는 진균에 대한 항균 및 항진균용 약학적 조성물.

청구항 7

삭제

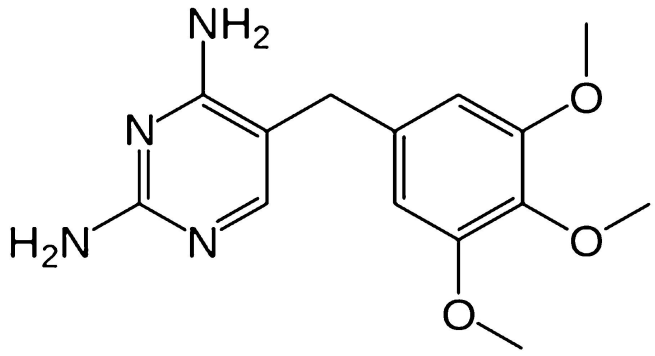
청구항 8

삭제

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주는 하기 [화학식 1]로 표시되는 트리메소프림(trimethoprim)을 생산하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물:

[화학식 1]



.

청구항 10

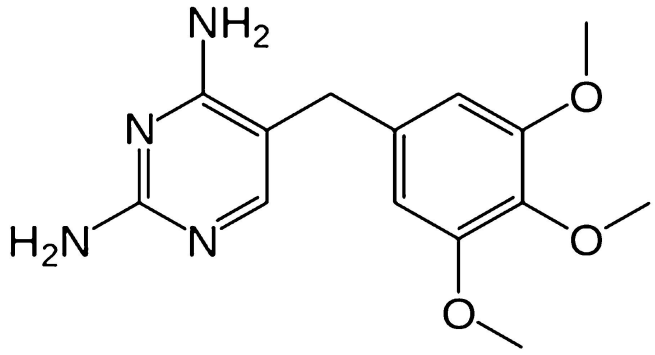
1) 수탁번호 KCTC 12434BP로 기탁된 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주를 배양하여 배양액을 수득하는 단계;

2) 상기 단계 1) 배양액에 유기용매를 가하거나, 또는 유기용매를 배양액에 직접 가하고 추출하여 추출물을 수득하는 단계;

3) 상기 추출물을 감압건조한 후, 박층 크로마토그래피를 이용하여 분획물을 수득하는 단계; 및

4) 상기 분획물로부터 추가로 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 하기 화학식 1로 표시되는 트리메소프림(trimethoprim)을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수탁번호 KCTC 12434BP로 기탁된 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 유래 트리메소프림 생산방법:

[화학식 1]



.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 야생 망초(*Conyza canadensis*)로부터 분리한 신규한 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 3E-1 균주 및 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 항균 또는 항진균용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 항생물질은 틴달(Tyndall)에 의해서 미생물 상호간의 길항 작용이 관찰된 후, 1929년 플레밍에 의해 발견된 페니실린을 기초로 하여 1940년에 스트렙토마이세스 안티바이오티커스(*Streptomyces antibioticus*)에서 엑티노마이신이 분리되었고, 스트렙토마이세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*)에서 스트렙토마이신을 분리하여 폐결핵의 치료약으로 사용하게 되었다. 스트렙토마이신이 발견된 이후로 많은 연구자들에 의해 스트렙토마이세스 속 균주로 부터 많은 종류의 항생물질이 발견되고 있으며, 최근에는 재조합기술을 이용하여 항생제를 생산하는 연구로 이루어지고 있다. 이에 스트렙토마이세스 속을 포함한 방선균류(Actinomycetes)는 항생물질의 생산균으로서 산업적 또는 의학적인 측면에서 매우 중요한 미생물로 자리잡게 되었다.

[0003] 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 균주는 다양한 2차 대사산물을 포함하여 생산하는 생리활성도 매우 다양하다. 특히 지금까지 미생물로부터 탐색된 100,000여종의 생리활성 물질 가운데 약 2/3에 해당되는 64% 정도가 스트렙토마이세스 속 균주로부터 발견되었으며, 세균으로부터는 약 13%, 곰팡이로부터는 약 23%가 발견되어 각종 생리활성 물질의 탐색에 있어서 이들 균이 차지하는 비중은 매우 높다.

[0004] 최근, 항생물질의 대한 내성균의 잦은 출현으로 인하여 새로운 항생제의 개발이 시급히 요구되고 있다. 특히 스타필로코코스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)는 그람 양성균 중에서 가장 주된 병원균이나, 메티실린에 대하여 내성을 나타내거나 심지어 최후의 치료약이라고 여겨지는 반코마이신에도 내성을 나타내기도 하여 새로운 항생제의 개발이 매우 시급하다.

[0005] 또한, 현재까지 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 균주를 이용한 병원성 미생물의 항균효과에 관한 연구로는 대한민국 특허등록 제10-461579호에 스트렙토마이세스 속 A6497(KCTC 10144BP) 및 이를 이용한 미생물 제초제에 대해 개시되어 있고, 대한민국 특허등록 제10-411185호에 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) AG-P(KCTC 8965P) 및 이를 이용한 식물병 방제제에 대해 개시되어 있으나, 다양한 세균 및 진균에 대한 유의적인 항균 및 항진균 활성을 나타내는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 균주에 대해서는 알려진 바 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 친환경적인 천연물 유래 항균 및 항진균제를 찾고자 노력한 결과, 야생 망초(*Conyza canadensis*)로부터 분리한 신규한 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 3E-1 균주 또는 이의 배양액은 유의적인 항균 및 항진균활성을 나타내고, 기존 항생물질로 알려진 트리메소프림(trimethoprim)을 유의적으로 생산하므로, 상기 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 또는 이의 배양액을 항균 또는 항진균용 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 수탁번호 KCTC 12434BP로 기탁된 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 3E-1 균주, 및 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 항균 또는 항진균용 조성물, 및 상기 균주로 부터 트리메소프림(trimethoprim) 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수탁번호 KCTC 12434BP로 기탁된 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 3E-1 균주를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 수탁번호 KCTC 12434BP로 기탁된 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 또는 이의 배앵액을 유효성분으로 함유하는 항균 또는 항진균용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 아울러, 본 발명은

[0011] 1) 스트렙토마이세스 속 균주를 배양하여 배양액을 수득하는 단계;

[0012] 2) 상기 단계 1) 배양액에 유기용매를 가하거나, 또는 유기용매를 배양액에 직접 가하고 추출하여 추출물을 수득하는 단계;

[0013] 3) 상기 추출물을 감압건조한 후, 박층 크로마토그래피를 이용하여 분획물을 수득하는 단계; 및

[0014] 4) 상기 분획물로부터 추가로 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 트리메소프림(trimethoprim)을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 속 균주 유래 트리메소프림 생산방법을 제공한다.

[0015]

발명의 효과

[0016] 본 발명의 야생 망초(*Conyza canadensis*)로부터 분리한 신규한 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 3E-1 균주 또는 이의 배양액은 유의적인 항균 및 항진균활성을 나타내고, 기존 항생물질로 알려진 트리메소프림(trimethoprim)을 유의적으로 생산하므로, 상기 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 또는 이의 배양액은 항균 또는 항진균용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 3E-1 균주의 항균 및 항진균 활성을 나타낸 도이다.

도 2는 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 배양액 상층(supernatant) 및 균체 추출액(extract)의 다양한 진균류 및 세균에 대한 생장저해환을 나타낸 도이다:

3E-1(S): 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 배양액 상층; 및

3E-1(E): 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 추출액.

도 3은 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주의 박층 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography; TLC) 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 TLC 분획물의 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 트리메소프림(trimethoprim)의 질량 스펙트럼(mass spectrum) 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 트리메소프림의 구조를 나타낸 도이다.

도 7은 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 추출물(a) 및 트리메소프림(b)의 HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 추출물로 부터 분리한 물질(a) 및 트리메소프림(b)의 질량 스펙트럼을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 수탁번호 KCTC 12434BP로 기탁된 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 3E-1 균주를 제공한다.

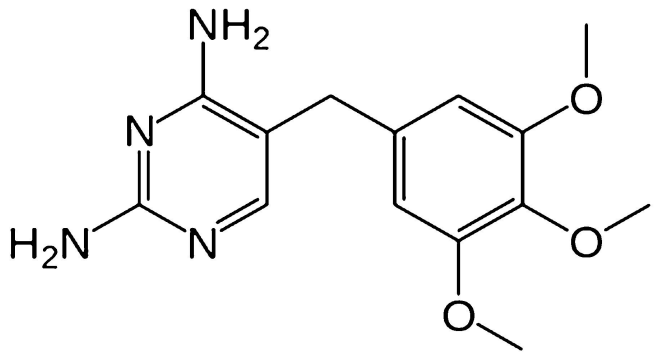
[0020] 상기 균주는 항균 및 항진균 활성을 가지는 것이 바람직하다.

[0021] 상기 균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*), 엔테로박터 클로캐(*Enterobacter cloacae*), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 대장균(*Escherichia coli*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 마이크로코코스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 수도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*), 세라치아 마르세센스(*Serratia marcescens*) 및 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로 구성된 균으로 부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다

[0022] 상기 진균은 알타나리아 알타나타(*Alternaria alternata*), 알타나리아 말리(*Alternaria mali*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 길레르몬디(*Candida guillermondii*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 캔디다 트로피카리스(*Candida tropicalis*), 콜레토트리쿰 그로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 파이토프소라 캡사이시 레오니안(*Phytophthora capsici Leonian*), 피리큘라리아 그리세아(*Pyricularia grisea*), 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*) 및 스클레로티니아 스클레로티오룸(*Sclerotinia sclerotiorum*)로 구성된 진균으로 부터 선택되는 어느하나 인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0023] 상기 균주는 하기 화학식 1로 표시되는 트리메소프림(trimethoprim)을 생산하는 것이 바람직하다:

[0024] [화학식 1]



[0025] .

[0026] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 야생 망초의 뿌리로 부터 균주를 분리하여 동정한 후, 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 본 발명의 균주는 서열번호 3으로 기재되는 16S rRNA 염기서열을 가지며 *Streptomyces griseorubiginosus* LMG 19941(T)와 99.6% 정도의 상동성을 나타내는 신규한 균주를 확인하고, 이를 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 3E-1 균주로 명명하고, 2013년 06월 24일자로 한국생명공학연구원 생명자원센터에 수탁번호 KCTC 12434BP호로서 기탁하였다.

[0027] 또한, 본 발명자들은 상기 분리한 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주의 생장 관련 생리적 특성을 확인한 결과, 본 발명의 균주는 pH 7-8 및 30-37℃의 온도 범위, 그리고 0-1%의 NaCl 농도에서 최적으로 생장하는 것을 확인하였다.

[0028] 또한, 본 발명자들은 상기 분리한 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주의 항균 또는 항진균 활성을 확인한 결과, 본 발명의 균주 배양액 상층(supernatant) 및 균체 추출액(extract)은 다양한 진균류 및 세균에 대하여 광범위한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 1 및 도 2 참조).

[0029] 또한, 본 발명자들은 상기 분리한 균주로 부터 항균 활성 물질의 순수분리를 위하여, 상기 균주 추출액을 농축한 후, 박층 크로마토그래피를 수행한 결과, 3개의 분획을 발견하였고, 상기 분획으로 부터 질량분석을 이용해서 구조 분석 및 동정을 수행한 결과, 본 발명의 균주는 기존에 항생물질로 알려진 트리메소프림(trimethoprim)을 생산하는 것을 확인하였다(도 3 내지 8 참조).

[0030] 또한, 본 발명은 수탁번호 KCTC 12434BP로 기탁된 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 또는 이의 배앵액을 유효성분

으로 함유하는 항균 또는 항진균용 약학적 조성물을 제공한다.

[0031] 상기 균주 또는 이의 배양액은 항균 및 항진균 활성을 가지는 것이 바람직하다.

[0032] 상기 균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*), 엔테로박터 클로캐(*Enterobacter cloacae*), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 대장균(*Escherichia coli*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 마이크로코코스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 수도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*), 세라치아 마르세센스(*Serratia marcescens*) 및 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로 구성된 균으로 부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다

[0033] 상기 진균은 알타나리아 알타나타(*Alternaria alternata*), 알타나리아 말리(*Alternaria mali*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 길레르몬디(*Candida guillermondii*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 캔디다 트로피카리스(*Candida tropicalis*), 콜레토트리쿰 그로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 파이토프소라 캡사이시 레오니안(*Phytophthora capsici Leonian*), 피리큘라리아 그리세아(*Pyricularia grisea*), 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*) 및 스클레로티니아 스클레로티오륨(*Sclerotinia sclerotiorum*)로 구성된 진균으로 부터 선택되는 어느하나 인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0034] 상기 균주는 상기 화학식 1로 표시되는 트리메소프림(trimethoprim)을 생산하는 것이 바람직하다.

[0035] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 분리한 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주의 항균 또는 항진균 활성을 확인한 결과, 본 발명의 균주 배양액 상층(supernatant) 및 균체 추출액(extract)은 다양한 진균류 및 세균에 대하여 광범위한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 1 및 도 2 참조).

[0036] 따라서, 본 발명의 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 또는 이의 배양액은 유의적인 항균 및 항진균활성을 나타내고, 기존 항생물질로 알려진 트리메소프림(trimethoprim)을 유의적으로 생산하므로, 상기 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주 또는 이의 배양액은 항균 또는 항진균용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 조성물은 통상적인 생균제 조성물 제조방법에 따라 제조될 수 있으며, 일반적으로, 배양현탁액이나 건조분말 형태일 수 있다. 또한, 주성분인 상기 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주, 또는 이의 배양액의 유효량에 1종 또는 2종 이상의 약제학적으로 허용 가능한 통상적인 담체 또는 1종 또는 2종 이상의 첨가제를 선택하여 통상적인 제형의 조성물로 제조할 수 있다.

[0038] 담체는 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 방부제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있으며, 첨가제로는 향료, 비타민류, 항산화제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있다.

[0039] 본 발명에 있어서, 담체 및 첨가제는 약제학적으로 허용 가능한 것은 모두 사용이 가능하며, 구체적으로는 희석제로는 유당(lactose monohydrate), 트레할로스(Trehalose), 옥수수 전분(cornstarch), 콩기름(soybean oil), 미결정 셀룰로오스(microcrystalline cellulose) 또는 만니톨(D-mannitorl)이 좋고, 활택제로는 스테아린산 마그네슘(magnesiumstearate) 또는 탈크(talc)가 바람직하며, 결합제로는 폴리비닐피롤리돈(PVP: polyvinyipyrolidone) 또는 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC: hydroxypropylcellulose) 중에서 선택함이 바람직하다. 또한, 붕해제로는 카르복시메칠셀룰로오스칼슘(Ca-CMC: carboxymethylcellulose calcium), 전분글리콜산나트륨(sodium starchglycolate), 폴라크릴린칼륨(polacrylin potassium) 또는 크로스포비돈(cross-linked polyvinylpyrrolidone)중에서 선택함이 바람직하고, 감미제로는 백당, 과당, 소르비톨(sorbitol) 또는 아스파탐(aspartame) 중에서 선택되고, 안정제로는 카르복시메칠셀룰로오스나트륨(Na-CMC: carboxymethylcellulose sodium), 베타-싸이크로덱스트린(β-cyclodextrin), 백납(white bee's wax) 또는 잔탄검(xanthan gum) 중에서 선택되며, 방부제로는 파라옥시안식향산메칠(methyl p-hydroxy benzoate, methlparaben), 파라옥시안식향산프로필(propyl p-hydroxybenzoate, propylparaben), 또는 소르빈산칼륨(potassium sorbate) 중에서 선택하는 것이 바람직하다.

[0040] 또한, 본 발명은

[0041] 1) 스트렙토마이세스 속 균주를 배양하여 배양액을 수득하는 단계;

[0042] 2) 상기 단계 1) 배양액에 유기용매를 가하거나, 또는 유기용매를 배양액에 직접 가하고 추출하여 추출물을 수득하는 단계;

[0043] 3) 상기 추출물을 감압건조한 후, 박층 크로마토그래피를 이용하여 분획물을 수득하는 단계; 및

[0044] 4) 상기 분획물로부터 추가로 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 하기 화학식 1로 표시되는 트리메소프림(trimethoprim)을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는스트렙토마이세스 속 균주 유래 트리메소프림 생산방법을 제공한다.

[0045] 상기 단계 1)의 스트렙토마이세스 속 균주는 수탁번호 KCTC 12434BP로 기탁된 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 3E-1 균주인 것이 바람직하다.

[0046] 상기 유기용매는 아세톤, 에탄올 또는 메탄올을 사용하여 추출하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출은 상온에서 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 배양액에 흡착수지를 사용하지 않고, 초산에틸, 염화메틸렌 또는 에테르 등의 유기용매를 직접 가하여 추출물을 제조할 수 있다.

[0047] 상기 추출 방법은 초임계추출, 고압추출 또는 초음파추출법 등의 추출장치를 이용한 방법, 및 배양액의 박테리아 세포를 여과 또는 원심분리하여 제거한 후 배양액을 직접 건조하여 추출물을 제조하는 방법으로 대체 가능하나 이에 한정되지 않는다.

[0048] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압건조는 회전진공농축기(Rotary Vacuum Evaporator), 동결건조 또는 분사건조를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 감압건조시 온도는 20 ~ 40℃인 것이 바람직하고, 30℃인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0049] 상기 방법에 있어서, 단계 크로마토그래피는 실리카겔, 세파덱스, 실리카기반 역상 수지, 폴리머기반 역상수지, 폴리아미드, HP20, 도요펄(Toyopearl) 및 XAD 수지로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 충진제를 이용한 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 활성 화합물을 분리 및 정제할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0050] 컬럼 크로마토그래피는 필요에 따라 적절한 충진제를 선택하여 수차례 실시할 수 있으며, 유출용매로 클로로포름, 염화메틸렌, 헥산, 석유에테르, 에테르, 초산에틸, 아세톤, 메탄올, 에탄올, 아세토니트릴 및 물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나를 이용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0051] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0052] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0053] **<실시예 1> 신규한 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 균주의 분리 및 동정**

[0054] **<1-1> 신규한 스트렙토마이세스 속 균주의 분리**

[0055] 신규한 스트렙토마이세스 속 균주를 분리하고 위하여, 야생 망초의 뿌리를 표면 소독한 다음 파쇄한 후, 녹말-카제인 한천배지(soluble starch, 10 g; vitamin free casein, 0.8 g; sodium chloride, 2.0 g; potassium nitrate 2.0 g; magnesium sulphate heptahydrate, 0.05 g; calcium carbonate, 0.02 g; ferric sulphate heptahydrate, 0.01 g; potassium phosphate monobasic, 5.45 g; agar, 2%; distilled water, 1 L)에 접종하였다. 그런 다음, 30℃에서 10일간 배양하여 나타난 콜로니를 순수배양을 통해 분리하였다.

[0056]

[0057] **<1-2> 신규한 스트렙토마이세스 속 균주의 동정**

[0058] 상기 실시예 <1-1>에서 분리한 균주의 동정을 수행하였다

[0059] 구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 분리한 균주로부터 DNA를 추출한 후 이를 주형으로 16S rRNA 유전자를 PCR 증폭하였다. PCR 증폭에 사용한 프라이머는 27F(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3': 서열번호 1)와 1492R(5'-

GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3': 서열번호 2)였고, 증폭된 PCR 산물을 정제한 후 염기서열을 분석하였다. 확보한 염기서열은 GenBank 및 EzTaxon을 이용하여 동정하였다.

[0060] 그 결과, 본 발명의 균주는 *Streptomyces griseorubiginosus* LMG 19941(T)와 99.6% 정도의 상동성을 나타내는 신규한 균주임을 확인하였다. 이에, 상기 균주를 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 3E-1 균주로 명명하고, 2013년 06월 24일자로 한국생명공학연구원 생명자원센터에 수탁번호 KCTC 12434BP호로서 기탁하였다.

[0061] **<실시예 2> 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주의 생리적 특성 분석**

[0062] 상기 <실시예 1>에서 분리한 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주의 생장 관련 생리적 특성을 조사하기 위해 pH(2-12), 온도(4-55℃) 및 NaCl(0-5%)의 농도를 각각 달리 한 배지에서 배양하여 각각 조건에서의 생장 범위 및 최적 생장조건을 측정하였다.

[0063] 그결과, 본 발명의 균주는 pH 7-8 및 30-37℃의 온도 범위, 그리고 0-1%의 NaCl 농도에서 최적으로 생장하는 것을 확인하였다.

[0064] **<실시예 3> 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주의 항균 및 항진균 활성 확인**

[0065] **<3-1> 균주의 배양**

[0066] 상기 <실시예 1>에서 분리한 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주는 TSA 배지(casein 15g; soybean 5g; sodium chloride 5g; agar 15g; 증류수 1L) 또는 1/2 ISP 2 배지(yeast extract 0.2g; glucose 0.2g; Malt extract 0.5g; agar 18g; 증류수 1L)에 도말하여 30℃에서 3~4주 배양한 후, 상기 배양된 균주가 포자를 형성하면 500 ml의 삼각 플라스크에 150 ml의 GSS 액체배지(glucose 20g; soybean meal 25g; soluble starch 10g; beef extract 1g; yeast extract 4g; sodium chloride 2g; dipotassium phosphate 0.25g; calcium carbonate 2g; 증류수 1L)에 포자 상태로 접종하여 30℃의 shaking incubator에 180 rpm으로 10일간 배양하여 약 100 ml 내지 120 ml의 배양액을 수득하였다.

[0067] **<3-2> 항생활성 확인**

[0068] 상기 실시예 <3-1>에서 배양한 배양액을 원심분리하여 세포 배양체와 상등액으로 분리하였다. 그 중 배양체는 80%의 아세톤을 첨가하여 shaking incubator에 180 rpm으로 4시간동안 교반하여 배양체의 항균활성 물질을 추출한 후, 여과하여 농축하였다. 한편 상등액 역시 농축하여 항생작용 실험에 이용하였다. 농축액을 멸균된 지름 8 mm의 원형 종이디스크에 떨어뜨린 후 검정대상 미생물을 도말한 한천배지에 올려놓은 후 배양하였다. 항생활성 검정에 이용된 박테리아 및 진균은 각각 하기 [표 1] 및 [표 2]에 나타내었다. 항생활성은 종이디스크를 중심으로 생장저해환의 생성 여부 및 저해환의 지름의 측정을 통해 결정하였다.

표 1

[0069]

학명	균주기호
바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)	KCTC 3135
바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)	CCARM 3
코리네박테리움 디프테리아 (*Corynebacterium diphtheriae*)	KCTC 3075
엔테로박터 클로캐(*Enterobacter cloacae*)	KCTC 2361
엔테로코커스 패칼리스 (*Enterococcus faecalis*)	V583
대장균(*Escherichia coli*)	KCTC 2441
대장균(*Escherichia coli*)	CCARM 227
클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)	KCTC 2208
클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)	CCARM 15
마이크로코코스 루테우스(*Micrococcus luteus*)	CCARM 22

수도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)	KCTC 1750
살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*)	KCTC 12456
살모넬라 티피(*Salmonella typhi*)	CCARM 242
세라치아 마르세센스(*Serratia marcescens*)	KCTC 12457
스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)	USA300
스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)	CCARM 203

표 2

[0070]

학명	균주기호
알타나리아 알타나타(*Alternaria alternata*)	KACC 42131
알타나리아 말리(*Alternaria mali*)	KACC 40846
보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*)	KACC 40573
캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)	KACC 7270
캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)	KACC 7965
캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)	KACC 7753
캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)	KACC 14021
칸디다 길레르몬디(*Candida guillermondii*)	KACC 14018
칸디다 크루세이(*Candida krusei*)	KACC 14017
캔디다 트로피카리스(*Candida tropicalis*)	KACC 14019
콜레토트리쿰 그로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*)	KACC 40003
푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)	KACC 41083
푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*)	KACC 41093
파이토프소라 캡사이시 레오니안 (*Phytophthora capsici Leonian*)	KACC 40476
피리큘라리아 그리세아(*Pyricularia grisea*)	KACC 40414
리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*)	KACC 40113
스클레로티니아 스클레로티오룸 (*Sclerotinia sclerotiorum*)	KACC 41065

[0071] 그 결과, 도 1 및 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 균주 배양액 상층(supernatant) 및 균체 추출액(extract)은 다양한 진균류 및 세균에 대하여 광범위한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 1 및 도 2).

[0072] **<실시예 4> 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주로 부터 항균활성 물질 동정**

[0073] **<4-1> 박층 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography; TLC) 분석**

[0074] 상기 <실시예 1>에서 분리한 신규한 스트렙토마이세스 속 3E-1 균주로부터 박층 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography; TLC)를 이용하여 항균활성 물질을 분리하였다.

[0075] 구체적으로, 상기 실시예 <3-2>에서 제조한 배양액 추출액을 농축하여 10 cm × 20 cm의 TLC plate(Merck, KGaA, Germany)을 고정상으로, 클로로포름:메탄올(1:1) 혼합액을 전개용매로 하여 1시간 30분간 전개 하였다. 이렇게 전개 하여 분리된 물질들은 UV 254 nm에서 관찰 하여 분리된 실리카겔 밴드들을 긁어 모아 아세톤, 에탄올, 증류수, 그리고 증류수: 메탄올: 아세토나이트릴을 1:1:1로 혼합하여 만든 유기용매에 각각 녹였고, 수집한 분획이 항균활성이 있는지 확인하기 위해서 상기 실시예 <3-2>와 동일한 방법으로 Paper diffusion assay를 수행 하였다.

[0076] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 박층 크로마토그래피 후, UV 상에서 관찰한 결과 3개의 밴드들이 Rf 0.75~0.91 부근에서 나타났고, 밴드 3(Rf=0.75)이 가장 진하게 나타나는 것을 확인하였다. 또한, 각각의 밴드를 긁어 모아 100% 아세톤으로 추출하였고, 농축하여 항균활성을 검정한 결과, 상기 밴드 3만 활성을 가지는 것

으로 나타났고, 다른 spot에서는 항생활성이 검출되지 않는 것을 확인하였다(도 3).

[0077] **<4-2> 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 분석**

[0078] 상기 실시예 <4-1>의 TLC 결과 얻은 분획의 분리를 위하여 HPLC 분석(HPLC separation YL 9100, Younglin Ltd. Korea)을 수행하였다.

[0079] 구체적으로, HPLC 분석은 Agilent Eclips C-18(250mm X 4.6mm) 컬럼을 이용하였고, 이동상은 H_2O:methanol:acetonitrile의 1:1:1 혼합액을 이용하여 분당 1 ml의 유속으로 전개하였으며, 검출은 UV detector(285 nm)를 이용하여 제조사에 프로토콜에 따라 실험을 수행하였다.

[0080] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, TLC 결과 나타난 spot을 긁어 모은 후 추출하여 HPLC를 수행한 결과, retention time 3.6 min 부근에서 단일한 peak을 수득하였다(도 4).

[0081] **<4-3> 질량분석**

[0082] 질량분석은 LCQ™Deca XP Plus(Ion Trap Mass Spectrometer)을 이용하여 분자량을 추정하였고, 각 이온들의 분열 양상을 관찰하여 스펙트럼을 수득하였다. 상기 확보한 스펙트럼은 Mass Bank(www.massbank.jp)를 이용하여 동정을 실시하였다.

[0083] 그 결과, TLC 및 HPLC로부터 분리된 활성물질의 질량분석 결과 110.2, 201.1, 230.1, 257.2, 275.3, 291.1(질량/전하 비; m/z ratio)를 가진 peak 들이 관측되었다. 또한, 이를 Mass Bank를 이용하여 동정을 시도한 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 항생물질인 trimethoprim(화학식 $C_{14}H_{18}O_4N_3$)과 가장 유사한 스펙트럼을 보이는 것을 확인하였다(도 5). Trimethoprim은 세균이 thymine을 합성하는데 필요한 효소인 dihydrofolate reductase의 활성을 저해하는 물질로 알려져 있고, 구조는 도 6과 같다.

[0084] 또한, 도 7에 나타낸 바와 같이, 상기 TLC 결과 분리한 물질과 trimethoprim이 동일 물질인지의 여부를 확인하기 위하여 상기 동일한 방법으로 HPLC 분석을 실시한 결과, 분리물질과 trimethoprim은 3.1-3.2 min의 retention time을 보여 동일한 retention time을 가지는 물질임을 확인하였다(도 7).

[0085] 아울러, 도 8에 나타낸 바와 같이, 상기 분리된 물질과 trimethoprim이 동일한 물질인지 확인하기 위해 질량 스펙트럼을 얻어 비교한 결과 두 물질은 서로 동일한 스펙트럼을 보이는 것으로 확인하였다(그림 9).

수탁번호

[0086]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12434BP

수탁일자 : 20130624

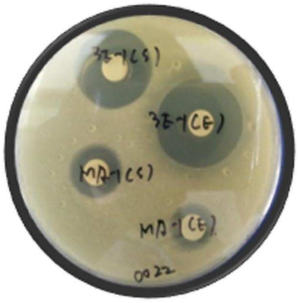
도면

도면1

검정균주	상등액	균체추출액
<세균>		
Bacillus subtilis KCTC 3135	+++	+++
Klebsiella pneumoniae	++	++
Micrococcus luteus CCARM 0022	+	++
Salmonella enterica KCTC 12456	++	++
Serratia marcescens KCTC 12457	-	+
Staphylococcus aureus CCARM 0203	++	++
Staphylococcus aureus USA300	+	+
Staphylococcus enterica 12456	++	++
<진균>		
Candida albicans KCTC 7270	+	++
Phythopthora capsicileonian KACC 40476	++	++
Sclerotinia sclerotiorum KACC 41065	+	+

도면2

마이크로코코스 레테우스



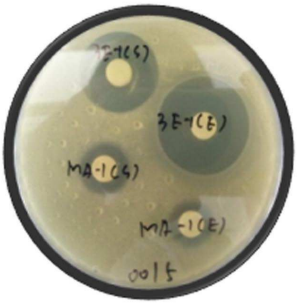
살모넬라 엔테리카



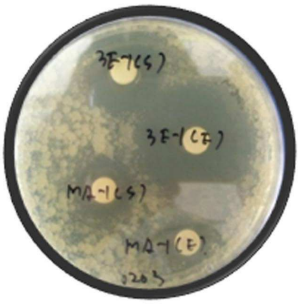
스클레로티니아 스클레로티오룸



클렙시엘라 뉴모니아



스타필로코커스 아우레우스



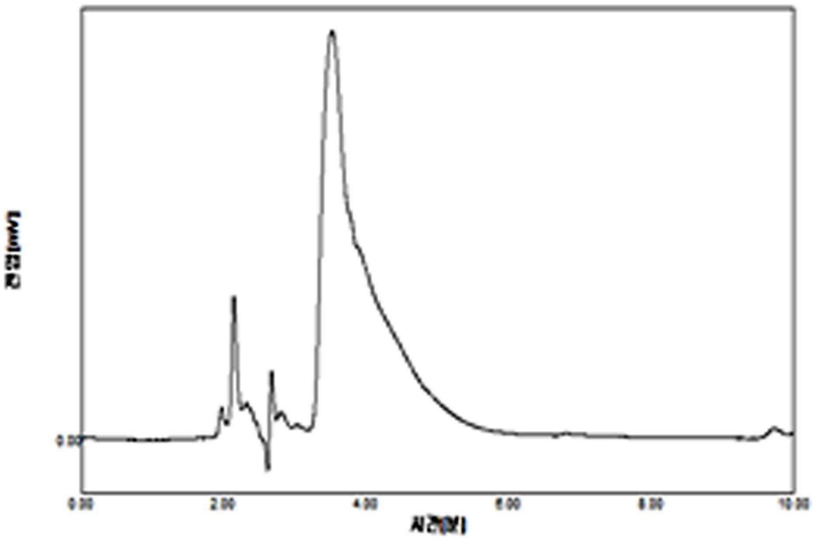
캔디다 알비칸스



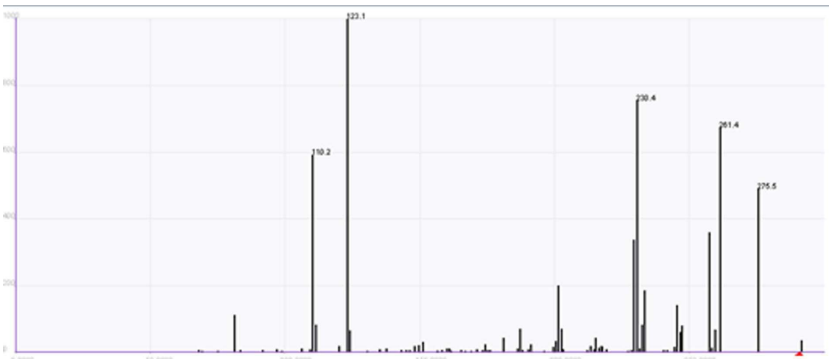
도면3



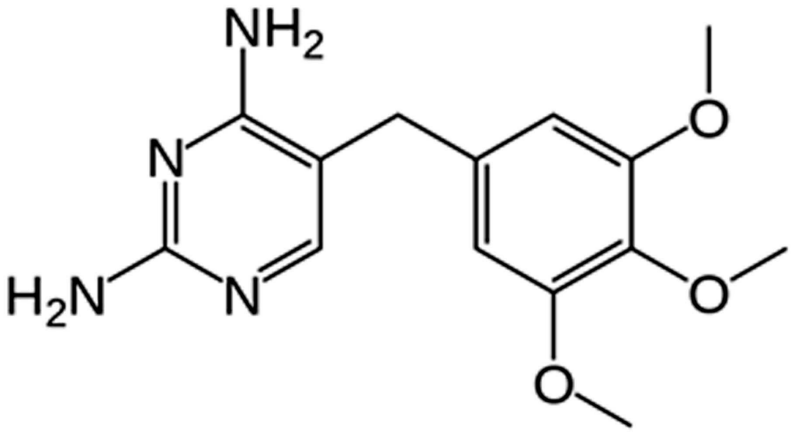
도면4



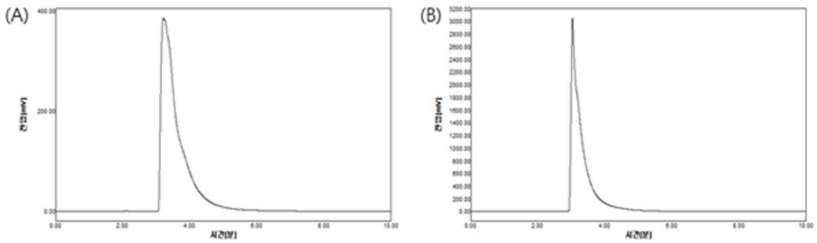
도면5



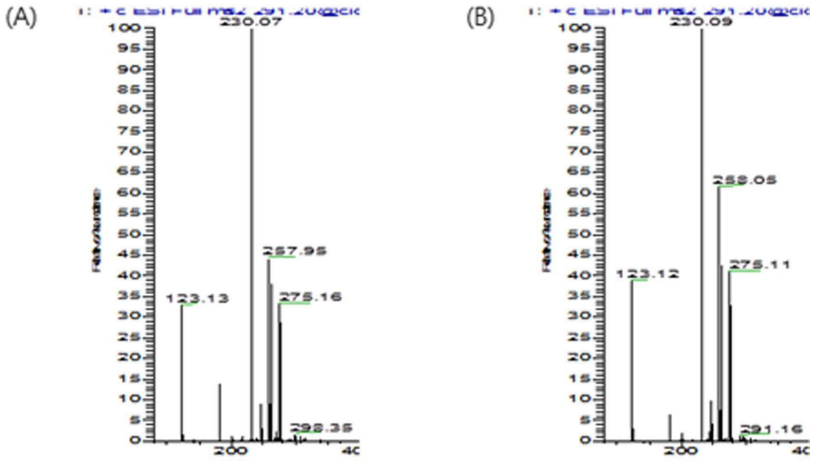
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록

<110> CHUNGNAM UNIVERSITY ACADEMIC INDUSTRIAL COOPERATION

<120> Composition for antibacterial compound containing Streptomyces sp. 3E-1 or its culture fluid as an active ingredient

<130> 12p-10-08

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 27F

<400> 1

agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1492R

<400> 2

ggytaccttg ttacgactt 19

<210> 3

<211> 1478

<212> DNA

<213> Streptomyces sp. 3E-1

<400> 3

tggctcagga cgaacgctgg cggcgtgctt aacacatgca agtcgaacga tgaaccactt 60

cggtggggat tagtggcgaa cgggtgagta acacgtgggt aatctgccct tcactctggg 120

acaagccctg gaaacggggt ctaataccgg atatcacttg cgcaggcatc tgtgcgggtt 180

gaaagctccg gcggtgaagg atgagcccgc ggcctatcag cttgttggtg aggtaacggc 240

tcaccaaggc gacgacgggt agccggcctg agagggcgac cggccacact gggactgaga 300

cacggcccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gcgcaagcct 360

gatgcagcga cgccgcgtga gggatgacgg ccttcgggtt gtaaacctct ttcagcaggg 420

aagaagcgca agtgacggta cctgcagaag aagcgccggc taactacgtg ccagcagccg 480

cggtaatacg tagggcgcaa gcgttgtccg gaattattgg gcgtaaagag ctcgtaggcg 540

gcttgtcacg tcgggtgtga aagcccgggg cttaaccccg ggtctgcatt cgatacgggc 600

aggctagagt gtggtagggg agatcggaat tcctggtgta gcggtgaaat gcgcagatat 660

caggaggaac accggtggcg aaggcggatc tctgggccat tactgacgct gaggagcgaa 720

agcgtgggga gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac ggtgggaact 780

aggtgttggc gacattccac gtcgtcggtg ccgcagctaa cgcattaagt tccccgcctg 840

gggagtacgg ccgcaaggct aaaactcaaa ggaattgacg gggcccgca caagcagcgg 900

agcatgtggc ttaattcgac gcaacgcgaa gaaccttacc aaggcttgac atacaccgga 960

aagcattaga gatagtgccc cccttgtggt cggtgtacag gtggtgcatg gctgtcgtca 1020

gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg tcctgtgttg 1080

ccagcgtgcc cttcggggtg acggggactc acaggagacc gccggggtca actcggagga 1140

aggtggggac gacgtcaagt catcatgccc cttatgtctt gggctgcaca cgtgctacaa 1200

tggcaggtac aatgagctgc aataccgtga ggtggagcga atctcaaaaa gcctgtctca 1260

attcggattg gggtctgcaa ctcgacccca tgaagtcgga attgctagta atcgcagatc 1320

agcattgctg cggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca cgtcacgaaa 1380

gtcggtaaca cccgaagccg gtggcccaac cccttgtggg agggagctgt cgaaggtggg 1440

actggcgatt gggacgaagt cgtaccaggg taaccgta 1478