

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0111091 (43) 공개일자 2012년10월10일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 35/74 (2006.01) A61K 35/66 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0029387 (22) 출원일자 2011년03월31일 심사청구일자 2011년03월31일		(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내 (72) 발명자 유진철 광주광역시 남구 광복마을길 53, 101동 1202호 (진월동, 새한아파트) 최윤희 광주광역시 북구 차미로39번길 23, 월드빌 301호 (신안동) 조승식 광주광역시 남구 봉선로9번길 22, 102동 1103호 (주월동, 현대) (74) 대리인 최성용

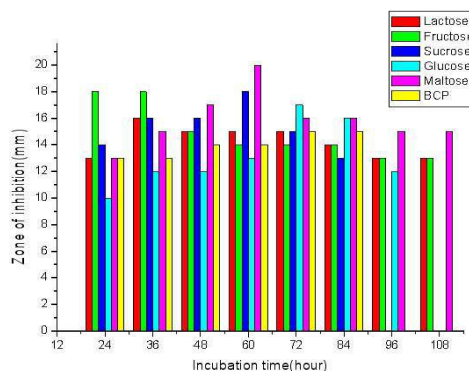
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 신규한 바실러스 아밀로리퀴페시언스의 배양물 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 바실러스 아밀로리퀴페시언스(*Bacillus amyloliquefaciens*) 균주 CS 61의 배양물 및 그의 용도에 관한 것으로서, 구체적으로는 바실러스 아밀로리퀴페시언스의 무독성 배양물 및 이를 포함하는 항산화제, 항염증제, 및 항생제 내성 병원성 미생물 또는 장내 유해 미생물의 성장을 저해하는 제약조성물에 관한 것이다. 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61균주로 부터의 배양물은 메티실린 내성 황색포도상 구균, 반코마이신 내성 장구균, 장내 유해 미생물인 엔테로코커스(*Enterococcus faecalis*), 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 성장을 효과적으로 저해하는 항균 능력을 보이므로 항생제 내성 병원성 미생물 또는 장내 유해 미생물의 성장을 억제 또는 저해하는 제약조성물로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, DPPH 라디칼 소거능과 높은 환원력을 나타내었으며, 일산화질소의 생성을 억제하므로 항산화제, 항염증제, 면역증강제 및 항생제 대체제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61 (*Bacillus amyloliquefaciens* CS61) 균주(KCTC11901BP)의 배양물을 유효 성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 2

제 1항에 있어서, DPPH 라디칼 소거능과 환원력을 보이는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 3

바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61 (*Bacillus amyloliquefaciens* CS61) 균주 배양물(KCTC11901BP)을 유효 성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 항염증제.

청구항 4

제 3항에 있어서, 일산화질소의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 항염증제.

청구항 5

바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61 (*Bacillus amyloliquefaciens* CS61) 균주(KCTC11901BP) 배양물을 유효 성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 항생제 내성 병원성 미생물 또는 장내 유해 미생물의 성장을 저해하기 위한 제약 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 항생제 내성 병원성 미생물이 메티실린 내성 황색포도상구균(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 또는 반코마이신 내성 엔테로코커스(vancomycin resistant *enterococcus*, VRE)인 것을 특징으로 하는 제약 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 장내 유해 미생물은 대장균(*E. coli*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 엔테로코커스(*Enterococcus*) 또는 살모넬라균(*Salmonella*)인 것을 특징으로 하는 제약 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 바실러스 아밀로리퀴페시언스(*Bacillus amyloliquefaciens*) 균주 CS 61의 배양물 및 그의 용도에 관한 것으로서, 구체적으로는 바실러스 아밀로리퀴페시언스의 무독성 배양물 및 이를 포함하는 항산화제, 항염증제, 및 항생제 내성 병원성 미생물 또는 장내 유해 미생물의 성장을 저해하는 제약조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 황색포도상구균은 일차적으로 피부와 연부조직에 감염을 일으켜 농피증(pyoderma)의 원인이 되고, 골수염, 심내막염, 폐혈증과 균혈증 등 생명을 위협하는 중한 전신 감염증을 유발하는 것으로 보고되고 있다[참조문헌: Herny Shinefield, M.D. et.al., *The New England J. of Med.* 346:491-496, 2002 참조]. 메티실린(methicillin) 등 포도상구균 항생제는 그 효과가 우수하여 지난 수 십년간 세균 감염증의 주요 치료약제로 사용되어 왔으나, 1961년 영국에서 메티실린에 내성을 보이는 균주(Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus*, MRSA)가 처음 보고된 이후 내성 균주는 전 세계적으로 지속적인 증가 추세를 보이고 있다.

[0003] 우리나라에서도 항생제의 무분별한 오남용으로 인한 내성 균주 출현은 특히 문제가 심각하여 메티실린 내성율이 50% 내외로 매우 높으며, 이러한 문제점이 대두되면서 위생학적으로 안전하고 효과적인 치료제의 개발이 절실한 상황이다.

- [0004] 한편, 동물의 몸속에 들어와 장에 살고 있는 세균을 총칭하여 장내 세균이라 하는데, 사람의 장에는 보통 약 1002조개의 장내 세균이 존재하며 그 종류만도 400여종 이상이다. 동물에 존재하는 장내 세균에는 유익한 세균과 유해한 세균이 있는데, 장내 유해 세균이 과다하게 존재하는 경우 장내 환경은 부패 환경으로 변하면서 악취가 심해지며 유해물질을 만든다. 이런 유해물질은 장 근육 운동에 영향을 미치거나 강한 발암 작용을 나타낸다. 물론 이러한 유해물질은 간에서 대부분 해독작용을 거치지만 독성물질이 많아지면 간 기능이 저하되어 피로해지고 각종 성인질환을 유발하는 원인이 된다.
- [0005] 장내 유해 세균으로는 엔테로코커스(*Enterococcus*), 리스테리아(*Listeria*), 황색포도상구균(*Staphylococcus*) 등이 대표적이다. 엔테로코커스(*Enterococcus*)에 감염되게 되면 심내막염, 복막염 또는 요로 감염증을 유발한다. 리스테리아(*Listeria*) 감염은 주로 폐혈증형으로 나타나며, 토끼에서는 출혈성, 괴사성 자궁염을 동반한 유산, 닭에서는 심근염, 근육부종, 간의 괴사를 보인다.
- [0006] 바실러스(*Bacillus*)는 많은 펩티드 항생제를 생산하고, 다양한 산업에 중요한 종으로써 식품과 산업용으로 안정성을 가지고 있어 항균 활성에 관한 흥미로운 종이다. 이미 많은 바실러스 종들이 박테리옌(Bacteriocin)과 박테리옌 유사물질(bacteriocin-like substances)을 생산하는 것으로 알려져 있다. 박테리옌은 세포에 부착되어 있거나 외부로 방출될 수 있고, 성장 주기(growth cycle) 전후에 생성될 수 있으며, 단백질 분해효소(protease) 같은 효소에 저항력을 가지며, pH, 온도에 안정적이다. 항균작용은 거의 알려져 있지 않으며, 세포막 채널(cell membrane channel)에 박혀 세포 용해(cell lysis)를 유도한다는 점이 보고되었다. 이러한 특징을 가지는 박테리옌은 항생제 대체제로써 부각되고 있으며, 식품의 부패방지제로 사용되는 항균물질이기 때문에 더욱 안전한 항균제라 할 수 있다.
- [0007] 항산화(antioxidant)란 체내에서 일어나는 여러 산화작용을 방지하는 것을 말한다. 산화작용은 체내에 존재하는 여러 종류의 불포화 지방산이 산소에 의해 산화되면 과산화 지질이라고 하는 물질이 생성되고 이것이 증가하면 노화 현상이 촉진되는 현상을 말한다. 질병 및 노화는 체내 대사과정 중 발생하는 O_2^- (superoxide), NO(nitric oxide), NO_2 (nitrogen dioxide), OH(hydroxyl), ROO(proxy), RO(alkoxy), HO_2 (hydroperoxy) 라디칼(radical) 등의 산화반응에 기인하며 생체 내에서는 이런 유해한 라디칼인 유리기로부터 생체를 방어하기 위한 수단으로써 슈퍼옥사이드 디스무타제(SOD, superoxide dismutase), 카탈라제(CAT:catalase), 글루타치온 퍼옥시다제(GSHpx:glutathione peroxidase) 등의 항산화 효소나 비타민 E, 글루타치온 등의 항산화 물질이 존재하여 유리기를 제거함으로써 생체를 산화적 손상으로부터 보호한다. 그러나 이러한 항산화 방어체가 유리기 생성을 조절할 수 없을 정도로 저하될 때 조직의 산화적 스트레스와 손상이 촉진되며 체내에서 생성된 과잉의 유리기와 지질 과산화물은 단백질의 산화, DNA 손상과 같은 산화적 스트레스에 의한 상해를 증가시킨다.
- [0008] 일산화질소(NO)는 염증과 암을 포함한 다양한 병리생리학적 과정에서 iNOS에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. NOS는 염증, 혈관확장, 신경전달, 종양세포와 신체의 항상성을 조절하는 중요한 효소로 L-아르기닌(L-arginine)으로부터 일산화질소(NO)를 생성하며, 염증 상태에서는 대식세포에 iNOS에 의해 일산화질소(NO)를 다량 생성하여 여러 만성질환을 일으키는 것으로 알려져 있다. 대식세포에서 일산화질소(NO)의 생성은 iNOS의 발현과 직접적으로 연관되어 있고, LPS는 그람 음성 세균의 세포벽 물질로서 면역 세포들을 자극하여 일산화질소(NO)의 생성을 상승적으로 증가시킨다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) 현재 국내외에서 장내 유해세균을 억제하기 위해 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*) 및 유산균 등을 이용하여 생균제 및 유해 미생물 생장 억제용 조성물을 개발하고 있다[참조문헌: G. Zheng and M.F. Slavik. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. Letters in Applied Microbiology 1999, 28, 363-367.; I. S. Bozaris and M.R. Adams. Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. Journal of Applied Microbiology 2001, 91 715-724.; Kim A. Brogden, Mark Ackermann, Paul B. McCray, Jr., Brian F. Tack. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. International Journal of Antimicrobial Agents 22(2003) 465-478.; 및 Charles E. Shelburne, Florence Y.An, Vishnu Dholpe, Ayyalusamy Ramamoorthy, Dennis E. Lopatin and Marilyn S. Lantz. The spectrum of antimicrobial activity

of the acteriocin subtilisin A. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2007(59), 297-300.]

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 이에 본 발명자들은 안전한 전통식품인 김치에서 신규한 용도의 미생물을 개발하기 위해 예의 연구한 결과, 바실러스 아밀로리퀴페시언스(*Bacillus amyloliquefaciens*) CS61 균주를 분리하는데 성공하였고, 상기 균주의 배양물이 항생제 내성 병원성 미생물과 장내 유해 미생물에 강력한 성장저해 효능을 가질 뿐만 아니라 항산화 및 항염의 효능을 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

- [0011] 따라서, 본 발명의 목적은 바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61균주로 부터의 배양물 및 이를 주성분으로 포함하는 항산화제, 항염증제 및 항생제 내성 미생물 또는 장내 미생물의 성장을 저해하는 균주의 배양물을 포함하는 무독성 제약 조성물을 제공하데 있다.
- [0012] 또한, 본 발명의 목적은 다른 일면에 있어서 식품 소재에서 얻은 유용 미생물의 무독성 배양물을 확보하여 친환경 항생제 대체제 생산 기술에 제공하는 데 있다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61 균주로 부터의 배양물은 메티실린 내성 황색포도상 구균, 반코마이신 내성 장구균, 장내 유해 미생물인 엔테로코커스(*Enterococcus faecalis*), 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 성장을 효과적으로 저해하는 항균 능력을 보이므로 항생제 내성 병원성 미생물 또는 장내 유해 미생물의 성장을 억제 또는 저해하는 제약조성물로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, DPPH 라디칼 소거능과 높은 환원력을 나타내었으며, 일산화질소의 생성을 억제하므로 항산화제, 항염증제, 면역증강제 및 항생제 대체제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명의 균주 배양 시 배지의 탄소원 이용능력 및 배양 시간별 병원성 미생물, 장내 유해 세균 성장 저해 효과를 나타낸 그래프도.
- 도 2는 본 발명의 균주의 배양 시 배지의 질소원 이용능력 및 배양 시간별 병원성 미생물, 장내 유해 세균 성장 저해 효과를 나타낸 그래프도.
- 도 3은 본 발명의 균주의 배양 시 배지의 금속이온 이용능력 및 배양 시간별 병원성 미생물, 장내 유해 세균 성장 저해 효과를 나타낸 그래프도.
- 도 4는 본 발명의 균주 배양물의 트립신과 프로네이즈 소화효소에 대한 항균활성의 안정성을 나타낸 그래프도.
- 도 5는 본 발명의 균주 배양 조성물의 DPPH 라디칼 소거능 시험법으로 항산화 효과를 나타낸 그래프도.
- 도 6은 본 발명의 균주 배양 조성물의 환원력 시험법으로 항산화 효과를 나타낸 그래프도.
- 도 7은 본 발명의 균주 배양 조성물의 희석 농도에 따른 NO 생성 억제 효과를 나타낸 그래프도.
- 도 8은 본 발명의 균주 배양 조성물의 희석 농도에 따른 NO가 억제 되는 농도에서의 세포생존율을 나타낸 그래프도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바실러스 아밀로리퀴페시언스(*Bacillus amyloliquefaciens*) CS61 균주의 무독성 배양물 및 이를 주성분으로 포함하는 항생제 내성 병원성 미생물 또는 장내 유해 미생물의 성장을 저해하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61 균주의 배양물을 유효성분으로 포함하는 DPPH 라디칼

소거능과 환원력을 보이는 항산화제를 제공한다.

- [0017] 또한, 본 발명은 바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61균주의 배양물을 유효성분으로 포함하는 일산화질소의 생성을 억제하며 세포독성을 나타내지 않는 항염증제를 제공한다.
- [0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명자들은 항생제 내성 병원성 미생물인 메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus*, MRSA)에 항균활성을 나타내는 미생물을 선별하기 위해 메티실린 저항성 황색포도상구균이 도말된 아가 플레이트에 김치 국물을 희석하고 함께 배양하여 투명환을 나타내는 집락을 선별하였다. 이 후 선별된 집락을 순수 분리하였으며, 최종 선별된 균주를 동정하여 "바실러스 아밀로리퀴페시언스(*Bacillus amyloliquefaciens*) CS61"로 명명하고, 이를 후술하는 바와 같이 한국생명공학연구원에 기탁하였다(KCTC11901BP).
- [0020] 이후 본 발명의 균주의 병원성 미생물에 대한 생장 저해 특성을 조사하기 위하여 항생제 내성세균과 장내 유해 미생물을 배양 후 생균수를 일정하게 고정하여 MH(muller hilton) 배지에 도말 후 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61 배양물로 항균활성을 관찰하였다. 그 결과, 바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61 배양물을 떨어뜨린 주변에 투명환이 형성됨으로 병원성 미생물의 생장을 효과적으로 저해함을 관찰하였다. 이를 통해 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61 배양물은 항생제 내성 병원성 미생물인 메티실린 저항성 황색포도상구균 균주 및 장내 유해 미생물의 생장을 효과적으로 저해함을 알 수 있다.
- [0021] 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61균주로 부터의 배양물은 메티실린 내성 황색포도상 구균, 반코마이신 내성 장구균, 장내 유해 미생물인 엔테로코커스(*Enterococcus faecalis*), 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 생장을 효과적으로 저해하는 항균 능력을 보이므로 항생제 내성 병원성 미생물 또는 장내 유해 미생물의 생장을 억제 또는 저해하는 제약조성물로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, DPPH 라디칼 소거능과 높은 환원력을 나타내었으며, 일산화질소의 생성을 억제하므로 항산화제, 항염증제, 면역증강제 및 항생제 대체제로도 유용하게 사용될 수 있고, 당업자는 그러한 질병, 상태 및 이상으로부터 고통을 받는 것으로 추정되는 개인들을 용이하게 파악할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 배양물은 공지의 의약품 담체와 조합하여 제약조성물로 제제화할 수 있다. 일반적으로는, 유효 성분을 약학적으로 허용할 수 있는 액상 또는 고체상의 담체와 배합하고, 또한 필요에 따라 용제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 부형제, 결합제, 붕괴제, 활택제 등을 가하고, 정제, 과립제, 산제, 분말제, 캡슐제 등의 고형제, 통상액제, 현탁제, 유제 등의 액제로 할 수 있다. 또한 이것을 사용 전에 적당한 담체의 첨가에 의해 액상으로 만들 수 있는 건조품으로 할 수도 있다.
- [0023] 본 발명의 제약 조성물은 경구제나, 주사제, 점적용제 등의 비경구제 중의 어떠한 것에 의해서도 투여할 수 있다.
- [0024] 의약품 담체는, 상기 투여형태 및 제형에 따라서 선택할 수 있고, 경구제의 경우는, 예를 들어 전분, 유당, 백당, 만니톨, 카복시메틸셀룰로스, 콘 스타치, 무기염 등이 이용된다. 또한 경구제의 조제에 있어서는 추가로 결합제, 붕괴제, 계면활성제, 윤택제, 유동성 촉진제, 교미제, 착색제, 향료 등을 배합할 수도 있다.
- [0025] 한편, 비경구제의 경우는 통상의 방법에 따라서 본 발명의 유효성분인 단백분해효소를 포함하는 조성물을 희석제로서의 주사용 증류수, 생리식염수, 포도당 수용액, 주사용 식물유, 참기름, 낙화생유, 대두유, 옥수수유, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 등에 용해 내지 현탁시켜서 필요에 따라 살균제, 안정제, 등장화제, 무통화제 등을 가함으로써 조제된다.
- [0026] 본 발명의 제약 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여경로로 투여된다. 투여방법은 특히 한정할 필요는 없고, 내용, 외용 및 주사에 의해 투여할 수 있다. 주사제는, 예를 들어 정맥내, 근육내, 피하, 피내 등에 투여할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 의약 조성물의 투여량은, 그 제제형태, 투여방법, 사용 목적 및 이것에 적용되는 환자의 연령, 체중, 증상에 따라서 적절히 설정되고, 일정하지 않지만 일반적으로는 제제 중에 함유되는 유효성분의 양은 성인 1일 당 예컨대 10 μ g?10 mg/kg이다. 그러나, 당업자는 특정 시약의 약물동력학적인 특성 및 그의 투여 모드 및 경로; 수여자의 나이, 건강, 체중; 증상의 성질 및 정도, 동시 치료의 종류, 치료의 빈도 및 목적하는 효과 등의 공지의 요인에 따라서 투여량이 변화함은 이해할 것이다.
- [0028] 본 발명의 배양물은 주성분의 함량이 특히 제한되지는 않으나, 예를 들면 조성물의 중량을 기준으로 0.1 내지

99.9%로 포함되어 제약 조성물의 제조에 사용될 수 있다.

[0029] 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0030] **실시예 1: 항균 활성을 나타내는 미생물의 분리**

[0031] 항생제 내성 병원성 미생물인 메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus*, MRSA)과 장내 유해 미생물에 항균 활성을 나타내는 미생물을 얻기 위하여 메티실린 저항성 황색포도상구균을 지시균으로 미리 도말한 MH(Muller Hilton)배지에 김치 국물을 0.85% NaCl에 희석하여 도말 후 37℃, 24 시간 배양하였다. 주변에 투명환을 나타내는 집락을 3차에 걸쳐 새로운 MH 배지에 옮겨 배양하는 방법으로 순수 분리하였다. 순수 분리 배양된 미생물 균수는 20% 글리세롤을 첨가하여 영하 80℃에 보존한 다음, 이를 후술하는 실시예에서 사용하였다.

[0032] 형태적인 특성은 그람염색법을 통하여 그람양성의 간균임을 확인하였고, 16S rRNA 유전자 염기서열결정 및 분석법을 통하여 바실러스 아밀로리퀴페시언스 (*Bacillus amyloliquefaciens*)로 동정되었다(표1 참고). 표 1은 본 발명의 균주 배양의 최적 배양시간 및 최적 pH에 관한 다른 종과의 비교표이다.

표 1

	Name/Title	Strain	Accession	Similarity	Diff/Total nt
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NBRC 15535(T)	AB255669	99.728	4/1472
2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NCIB 3610(T)	ABQL01000001	99.596	6/1484
3	<i>Bacillus vallismortis</i>	DSM 11031(T)	AB021198	99.528	7/1484
4	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NRRL B-23049(T)	AF074970	99.432	8/1409
5	<i>Bacillus tequilensis</i>	NRRL B-41771(T)	EU138487	99.401	7/1168
6	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	BGSC 3A28(T)	EU138467	99.401	7/1168
7	<i>Bacillus mojavensis</i>	IFO 15718(T)	AB021191	99.124	13/1484
8	<i>Bacillus atrophaeus</i>	JCM 9070(T)	AB021181	99.122	13/1480
9	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	LMG 21660(T)	AJ620368	99.122	13/1480
10	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580(T)	CP000002	97.842	32/1483
11	<i>Bacillus aerius</i>	24K(T)	AJ831843	97.772	33/1481
12	<i>Bacillus sonorensis</i>	NRRL B-23154(T)	AF302118	97.729	32/1409
13	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b(T)	AJ831842	97.23	41/1480
14	<i>Bacillus aerophilus</i>	28K(T)	AJ831844	97.1	43/1483
15	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41KF2a(T)	AJ831841	97.1	43/1483
16	<i>Bacillus safensis</i>	FO-036b(T)	AF234854	96.932	44/1434
17	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061(T)	ABRX01000007	96.831	47/1483
18	<i>Bacillus vietnamensis</i>	15-1(T)	AB099708	95.936	56/1378
19	<i>Bacillus aquimaris</i>	TF-12(T)	AF483625	95.74	63/1479
20	<i>Bacillus acidicola</i>	105-2(T)	AF547209	95.547	66/1482

[0033] **실시예 2: 바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61의 최적 생장 배지 분석**

[0035] 본 발명의 균주를 배양하기 위한 최적 생장 배지를 알아보기 위해 탄소원, 질소원 및 금속이온의 종류를 달리한 배지에서 배양한 후 배양물의 병원성 미생물, 장내 유해 세균에 대한 생장저해 효과를 분석하였다.

[0036] 2-1: 탄소원 이용능력 및 병원성 미생물, 장내 유해 세균 생장저해 효과

[0037] 효모 추출물을 1% 고정 후 탄소원의 종류를 달리하여 각각 1% 첨가하여 배양 배지를 제조하였다. 상기 배지에 실시예 1의 균주를 접종하여 37℃에서 시간을 달리하여 배양한 후 세포 배양액을 시간별로 수득해 균주의 유해 세균 저해 효과를 측정하였다. 측정 방법은 MH 배지에 메티실린 저항성 황색포도상구균을 도말 후 시간별로 수득한 균주의 배양액을 paper disc 위에 확산 시킨 후 37℃에서 12시간 배양 하여 투명환의 크기를 특정해 각 탄소원에 따른 생장저해 효과를 분석하였다.

[0038] 그 결과, 말토오스가 포함된 배지에서 60시간 배양 시 유해세균 생장저해 효과가 높았다(도 1 참고).

[0039] 2-2: 질소원 이용능력 및 항생제 내성 병원성 미생물, 장내 유해 세균 생장저해 효과

[0040] 본 발명의 균주의 질소원 이용능력을 알아보기 위해 실시예 2-1에서 유해 세균에 대한 생장 저해 효과가 뛰어난 탄소원인 말토오스를 1% 첨가 후 비프 추출물, 말트 추출물, 트립톤, 효모 추출물,オート밀, 소이, 펩톤을 질소원으로 하여 배양 배지를 제조하였다. 상기 배지에 본 발명의 균주를 접종하여 배양한 후 세포 배양액을 시간별로 수득해 균주의 유해세균 저해 효과를 측정하였다. 측정 방법은 MH배지에 메티실린 저항성 황색포도상구균을 도말 후 시간별로 수득한 균주의 배양액을 paper disc 위에 확산 시킨 후 37℃에서 12시간 배양 하여 투명한 크기를 측정해 각 질소원에 따른 생장저해 효과를 분석하였다. 그 결과, 비프 추출물을 질소원으로 포함하는 배지에서 60시간 배양 시 유해세균 생장저해 효과가 높았다(도2 참고).

[0041] 2-3: 금속이온 이용능력 및 병원성 미생물, 장내 유해 세균 생장저해 효과

[0042] 본 발명의 균주의 금속이온 이용능력을 알아보기 위해 실시예 2-1, 2-2에서 유해 세균에 대한 생장 저해 효과가 뛰어난 탄소원인 말토오스, 질소원인 비프 추출물을 각각 1%씩 첨가한 후 각 금속이온을 각각 0.1%씩 첨가하여 배지를 제조하였다. 상기 배지에 본 발명의 균주를 접종하여 배양한 후 세포 배양액을 시간별로 수득해 균주의 유해세균 저해 효과를 측정하였다. 측정 방법은 MH 배지에 메티실린 저항성 황색포도상구균을 도말 후 시간별로 수득한 균주의 배양액을 paper disc 위에 확산 시킨 후 37℃에서 12시간 배양 하여 투명한 크기를 측정해 각 금속이온에 따른 생장저해 효과를 분석하였다.

[0043] 그 결과, 금속이온을 포함한 배지에서 유해세균 생장저해 효과가 없음을 확인하였다(도 3 참고).

[0044] 실시예 3: 최적배지 배양 시 바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61 의 생장 조건 분석

[0045] 본 발명의 균주의 최적 생장 배양 시간 및 그 때의 최적 pH를 확인하고자 하였다. 구체적으로, 최적 생장 배양 시간을 알아보기 위하여 본 발명의 균주를 최적배지(말토오스 1%, 비프 추출물 1%) 조건으로 37℃에서 배양하면서 24시간 간격으로 세포 배양액을 수득하고 660nm의 흡광도에서 세포의 농도를 측정 및 pH, 항균활성 정도를 측정하였다(표 2 참고). 표 2는 본 발명의 균주 배양물의 각 온도에 따른 항균활성 안정성을 나타내는 표이다.

표 2

Parameters	Final pH	Bacterial growth(OD _{660nm})	Inhibition zone (mm)
Incubation period(hr)			
24	7.93	2.34	16
48	8.15	2.4	19
60	8.13	2.189	18
72	8.26	2.22	17
84	8.57	2.16	17
96	9.0	1.87	17
108	8.97	1.84	15
pH			
4	7.05	1.936	14
5	7.98	1.787	14
6	8.05	1.755	18
7	8.33	1.054	15
8	8.44	1.026	12
9	8.6	0.711	11

[0046]

[0047] 그 결과, 본 발명의 균주는 48~60시간 배양 시 생장 정도 및 항균활성이 우수하였으며 그 때의 pH는 8.05를 나타내었다.

[0048] 실시예 4: 균주 배양물의 내열성 및 효소 안정성

[0049] 본 발명의 균주 배양물을 필터 후 30℃, 40℃, 60℃, 100℃, 121℃에서 각각 30, 60, 120분 열처리 한 후 MRSA가 도말된 아가배지에 paper disc를 올리고 반응액을 확산시켜 12시간 후 항균활성을 확인하였다(표 3 참고). 표 3은 본 발명의 균주 배양물의 다양한 감염성 미생물에 대한 최소저해농도(MIC, Minum Inhibitory Concentration)를 나타낸 표이다.

표 3

Temperature(°C)	Exposure time(min)	Inhibition (mm)	Residual activity(%)
40°C	30	20	100
	60	20	100
	120	20	100
60°C	30	20	100
	60	20	100
	120	20	100
80°C	30	13	65
	60	13	65
	120	0	0
100°C	10	12	63.16
	30	12	63.16
	60	0	0
121°C	15	0	0

[0050]

[0051]

그 결과, 본 발명의 배양물을 100°C 이상 열처리 하였을 때 메티실린 저항성 황색포도상구균에 대한 항균 활성이 감소하는 경향을 확인하였다.

[0052]

또한 소화효소에 대한 항균활성의 안정성을 실시하였을 때 트립신과 프로네이즈효소가 본 배양물의 항균활성에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 4 참고).

[0053]

실시예 5: 바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61 배양물의 병원성 미생물, 장내 유해 세균에 대한 최소저해농도 분석

[0054]

본 발명의 균주의 배양물로의 항균활성 물질의 최소저해농도를 분석하기 위해 항생물질 감수성 시험(MIC, Minimum Inhibitory Concentration) 중 단계희석법을 수행하였다. 구체적으로, 바실러스 아밀로리퀴페시언스 CS61을 최적배지인 말토오스 1%, 비프 추출물 1% 배지에 접종 후 37°C에서 60시간 배양한 후 원심분리 하였다. 상층액에 60% 포화 황산 암모늄을 가한 후 원심분리하여 침전물을 10mM Tris-HCl(pH8.0)로 최소한 녹여 Sepharose CL-6B 컬럼 크로마토그래피와 sephadex G50 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 항균물질을 분리하였다.

[0055]

이렇게 분리한 항균물질을 각 농도별로 희석하여 MH 배지 10ml에 섞어 굳힌 후 준비하였다. 각 병원성 미생물과 장내 유해 세균을 MH 액체 배지에서 배양한 후 10^6 CFU/ml로 생균수를 조정하여 미리 준비한 배지에 스트리킹하고 12시간 후 균주 생육을 관찰하였다. 대조군으로는 반코마이신과 바시트라신을 사용하였다(표 4 참고).

표 4

Test organisms		MIC		
		Vancomycin	Bacitracin	BA6
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 1004	G(-)	>80	>80	>80
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	G(+)	2.5	5	5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	G(+)	0.3	40	>80
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1928	G(+)	5	>80	40
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	G(+)	2.5	40	>80
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 9341	G(+)	1.25	>80	40
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1925	G(-)	>80	>80	>80
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1923	G(-)	>80	>80	>80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1637	G(-)	>80	>80	>80
MRSA693E	G(+)	1.25	1.25	10
MRSA 4-5	G(+)	0.625	1.25	0.625
MRSA 5-3	G(+)	0.625	1.25	0.625
VRE 82	G(+)	>80	40	20
VRE 89	G(+)	>80	40	20
VRE 98	G(+)	>80	>80	20

[0056]

[0057]

그 결과, 그람음성균(살모넬라, 대장균, 슈도모나스)에는 항균력을 나타내지 않았으며 그람음성균(엔테로코커스, 황색 포도상구균, MRSA, VRE)에 강한 항균력을 보였다.

[0058]

실시예 6: DPPH 라디칼 소거능(DPPH radical scavenging activity)확인 실험

[0059]

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)를 사용한 방법으로 측정하였다. DPPH 1.2mg을 메탄올 10ml에 용해한 다음 DPPH 100 μ l에 CS61 배양물을 희석하여 준비한 시료 10 μ l, 메탄올 90 μ l을 혼합하여 상온에 10분간 방치시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하여 전자공여능으로 하였다. 무첨가구는 메탄올을 사용하였다(도 5 참고).

[0060]

항산화물질은 지질의 산화과정 중 생성되는 R-, ROO- 등의 유리라디칼에 전자를 전해주므로써 산화의 진행을 방지한다. 전자공여능은 유리라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있다. 도 5는 CS61 배양물의 DPPH 소거능을 나타낸 것으로 고농도에서 유리라디칼 소거능을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0061]

실시예 7: 환원력(Reducing power) 확인 실험

[0062]

본 발명의 균주의 배양물을 농도별로 희석하여 준비한 시료 200 μ l 당 0.2M 인산나트륨(Sodium phosphate buffer: pH 6.6)과 1% 페리시아화칼륨(potassium ferricyanide)을 각각 20 μ l씩 넣고 혼합하여 50℃에서 20분간 반응시켰다. 반응시킨 각 시료에 10% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid)을 200 μ l씩 가하여 혼합 후 10분간 원심분리 하였다. 상층액에 동량의 0.1% 염화제2철($FeCl_3$)을 첨가한 후, 700nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응시킨 시료의 높은 흡광도는 높은 환원력을 나타내었으며, 대조군으로 아스코르브산을 사용하였다(도 6 참고).

[0063]

도 6은 발명의 균주의 배양물의 환원력에 대한 효과를 나타낸 그래프도로서, 대조군인 아스코르브산과 비교하였을 때 고농도에서 CS61 배양물이 높은 환원력을 나타내었다.

[0064]

실시예 8: CS61 배양물에 의한 NO 생성억제 활성 및 세포생존률 측정

[0065]

본 발명 물질인 CS61 배양물이 NO 생성을 억제하는지 확인하기 위하여 비활성시에는 NO 생성 수준이 매우 낮으나, LPS로 활성화시킬 때 NO생성이 유도된다고 알려져 있는 대식 세포주인 Raw264.7 세포를 사용하여 CS61 배양물의 NO 생성 억제 효과를 측정하였다.

[0066]

구체적으로, Raw264.7 세포를 10% Fetal Bovine Serum(FBS)이 포함된 DMEM 배지에서 1×10^5 세포/ml의 농도로 현탁하여 96 웰플레이트에 분주한 다음, 5% CO_2 배양기에서 37℃의 조건으로 배양하였다. 상기 Raw264.7 세포를 배양하면서 CS61 배양물을 농도별로 희석한 시료와 최종농도 1 μ g/ml의 LPS를 함께 처리하였다. 대조군으로는 LPS를 처리하지 않은 군(NA), LPS만 처리한 군(LPS)를 사용하였으며 12시간 후 세포 배양액을 회수하여 NO의 양을 그리아스(Griess) 반응을 이용해 측정하여 그 결과를 도7에 나타내었다. 세포는 회수하여 세포생존률 측정에 이용하였으며, 세포생존율은 MTT 분석법에 따라 측정하여 그 결과를 도8에 나타내었다(도 7, 8 참조).

[0067] 도 7에 나타난 바와 같이, LPS만 처리한 군(LPS)에서는 NO가 과량 생산되었으며, LPS와 함께 본 발명의 CS61 배양물의 농도를 점차 증가하여 처리하였을 경우에는 그 농도가 증가할수록 NO의 생성이 더욱 억제됨을 확인할 수 있었으며, 도8에 나타난 바와 같이 이때 세포의 생존율에는 변화가 없음을 확인하였다.

[0068] 따라서, 본 발명의 CS61 배양물은 면역세포가 활성화 되었을 때 세포 생존율에는 변화를 일으키지 않는 무독성이며 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하고 있음을 알 수 있었다.

[0069] 실시예 9: 제약학적 제제

[0070] 제형의 형태(정제)

[0071] CS61 배양물(실시예 1) 10 mg

[0072] 락토오스 80 mg

[0073] 전분 17 mg

[0074] 스테아르산 마그네슘 3 mg

[0075] 결정성 셀룰로오스 10 mg

[0076] 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 연질캡셀 형태이다.

수탁번호

[0077]

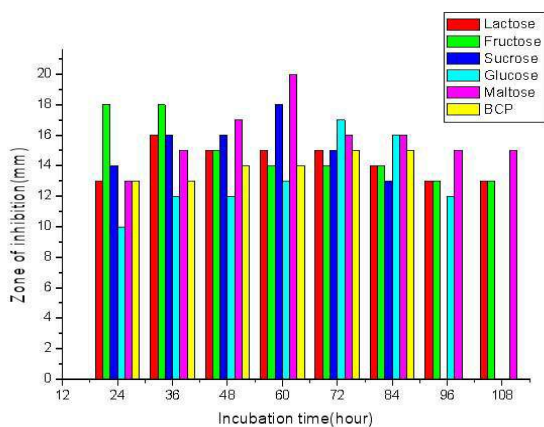
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11901BP

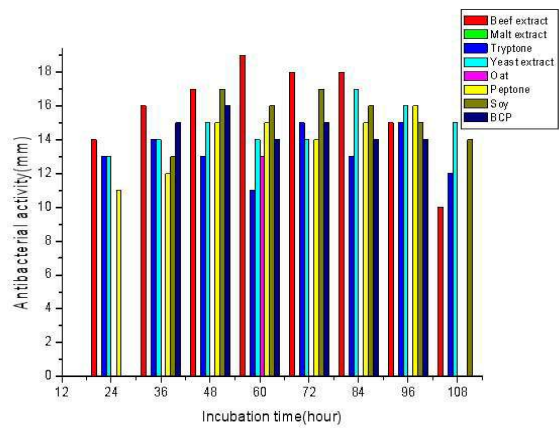
수탁일자 : 20110325

도면

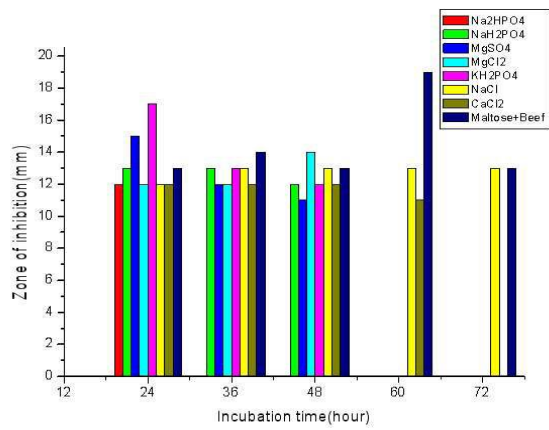
도면1



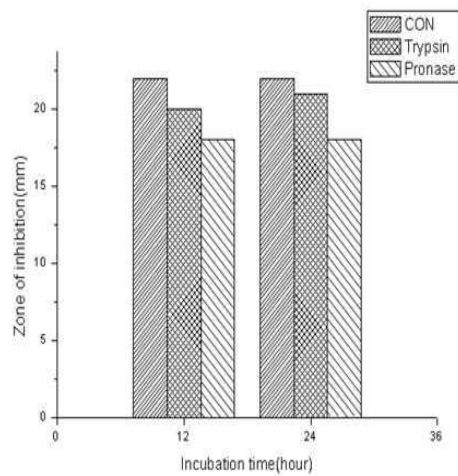
도면2



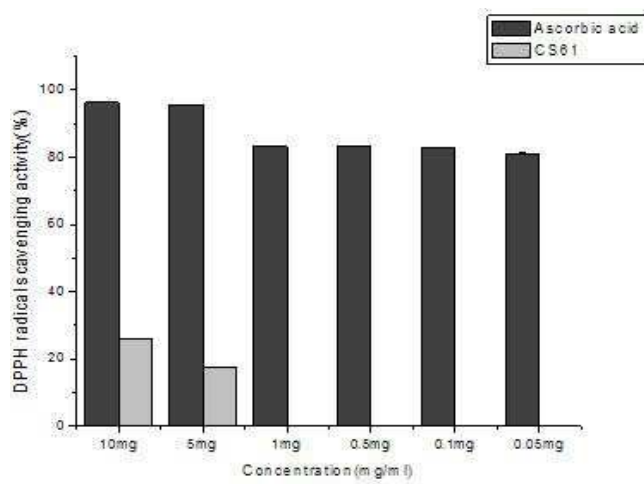
도면3



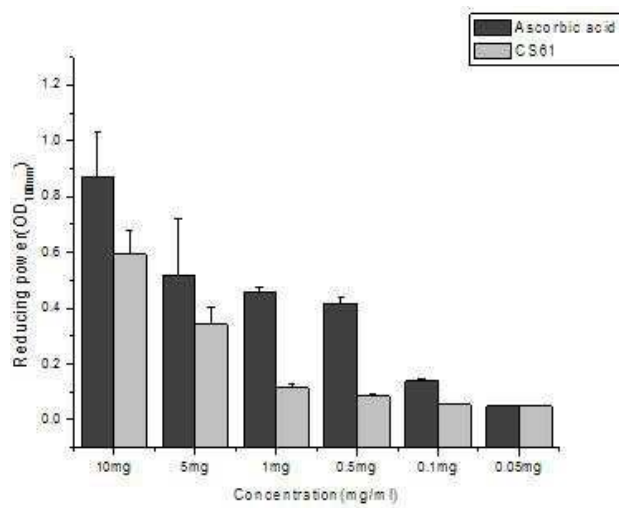
도면4



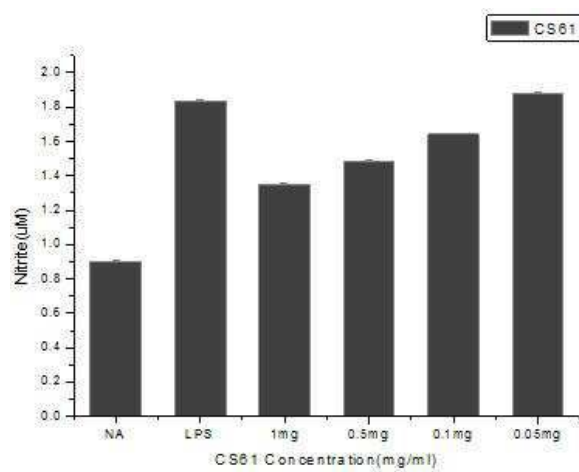
도면5



도면6



도면7



도면8

