(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C12N 1/20

(11) 공개번호 특2001-0100272
(43) 공개일자 2001년11월14일

(21) 출원번호 10-2000-0017728
(22) 출원일자 2000년04월04일

(71) 출원인 정건섭
강원 원주시 흥업면 매지리 234 연세대학교 생물자원공학과

(72) 발명자 정건섭
강원 원주시 흥업면 매지리 234 연세대학교 생물자원공학과
정병문
경상북도경산시진량읍우방힐타운105동1607호
우석규
경기도수원시장안구율전동319신일아파트105동803호

(74) 대리인 이한영

심사청구 : 있음

(54) 신규한 항균성 물질을 생산하는 락토바실러스 속 미생물

요약

본 발명은 여러가지 미생물에 대하여 항균활성을 나타내는 락토바실러스 속 미생물, 이로부터 분비되는 신규한 비 단백질성 항균물질 및 전기 미생물로 부터 전기 항균물질을 정제하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의하면, 전기 생산균주로 부터 생산되는 항균활성을 나타내는 물질이 단백질성 항균물질에 비하여 넓은 온도범위와 넓은 pH범위에서 안정하고, 넓은 항균범위를 나타내므로, 항균제 및 치료제 개발에 널리 활용될 수 있다.

대표도
도 1

색인어
KHANIN-ME1, 락토바실러스, 비 단백질성 항균물질

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 락토바실러스 속 미생물의 16S 소포체 RNA분석으로 작성된 진화계통수를 표시한 그림이다

도 2는 균주에서 생산된 항균물질이 세포 외부로 분비됨을 나타낸 사진이다.

도 3은 단백질분해효소에 의하여 항균물질이 영향을 받지 않음을 나타낸 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 항균활성을 갖는 락토바실러스 속(Lactobacillus sp.) 미생물 및 이로부터 생산되는 신규한 항균성 물질에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 여러가지 미생물에 대하여 항균활성을 나타내는 락토바실러스 속 미생물, 이로부터 분비되는 신규한 비 단백질성 항균물질 및 전기 미생물로부터 전기 항균물질을 정제하는 방법에 관한 것이다.

젖산균은 탄수화물을 이용하여 젖산(lactic acid)을 생산하는 미생물로 자연계에 널리 분포하고 있다. 젖산균은 발효형식에 따라서 호모(homo) 발효 젖산균과 헤테로(hetero) 발효 젖산균으로 구별된다. 호모 발효 젖산균은 포도당으로부터 85% 이상의 젖산을 생성하면서 가스는 생성하지 않는 발효특성을 보이며, 헤테로 발효 젖산균은 포도당으로부터 50% 이상의 젖산을 생성하면서 탄산가스, 에탄올 등을 함께 생성하는 발효특성을 가지고 있다. 이러한 젖산균들은 서양의 요거트, 치즈, 버터 등의 유제품이나 발효 소세지 등의 육제품 뿐만 아니라, 우리나라의 전통발효 식품인 김치류, 젓갈류, 장류 등에 많이 존재하며, 사람이나 동물의 장이나 질내에도 정상 미생물군으로 존재하고 있다. 또한, 이러한 젖산균의 대사산물 중 젖산, 초산, 프로피온산 등 여러 종류의 유기산들은 식품에 방향성을 부여함으로써 풍미를 증진시키는 역할을 할 뿐만 아니라, pH를 감소시켜 병원성 미생물이나 식품위생 미생물의 생육을 억제하는 작용을 하며, 유기산 자체가 항균력을 나타내기도 한다.

젖산균이 생산하는 물질들 중에는 전술한 유기산 이외에도, 단백질성 물질인 많은 종류의 박테리오신(bacteriocin)과 비 단백질성 물질인 애시돌린(acidolin), 애시도필린(acidophilin), 다이아세틸(diacetyl), 루테린(reuterin)등도 항균작용을 가진다고 알려져 있다. 단백질성 항균물질인 박테리오신은 인체에 섭취되는 즉시 소화기관의 단백질 분해효소에 의해서 쉽게 분해되어 잔류독성이 적을 뿐만 아니라, 종류에 따라서는 항균범위가 넓으며 내열성이 있는 물질도 있어서, 화학합성 보존제를 대체할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 젖산균이 생산하는 박테리오신은 락토바실러스(Lactobacillus), 락토코커스(Lactococcus), 류코노스톡 (Leuconostoc), 페디코커스(Pediococcus) 및 엔테로코커스(Enterococcus)속 젖산균에 의해 생산되는 박테리오신이 많이 보고되어 있다. 한편, 젖산균이 생산하는 대표적인 비 단백질성 물질인 애시돌린은 그람 양성세균과 그람 음성세균의 생육을 광범위하게 억제하는 분자량 198Da의 저분자 물질로 물, 메탄올, 아세톤 등에 용해되며, 121℃에서 15분동안의 열처리에도 안정하고, 4℃에서 30일 동안 방치하여도 안정하다고 알려져 있다. 또한, 애시도필린은 분자량이 284Da이며, 280nm에서 최대 흡광도를 나타내고 등전점의 pH는 2.8이며, 대장균, 살모넬라균, 락토바실러스 락티스(Lb. lactis), 락토바실러스 플랜테룸(Lb. plantarum) 등에 대해 항균효과를 가진다고 알려져 있다. 아울러, 다이아세틸은 젖산균 발효제품의 대표적인 향미 성분 중의 하나로, pH와 상호작용으로 병원성 미생물에 대해 강한 항균작용을 가지며, 그람 음성세균의 아르기닌 결합단백질과 작용함으로써 아르기닌의 이용을 방해하는 것으로 알려져 있다. 끝으로, 항균활성을 나타내는 또 다른 물질인 루테린은 수용성의 비 단백질성 물질로 글리세롤의 대사과정 중에 생성되며, 리보핵산 환원효소(ribonucleotide reductase)나 티오독신(thioredoxin)의 작용을 방해함으로써 항균작용이 나타난다고 추측되는데, 분자량은 148Da으로 아주 작고 휘발성이 있으며, 그람 양성세균, 그람 음성세균, 곰팡이, 원생동물(protozoa) 등 넓은 범위의 항균범위를 가지는 물질로 알려져 있다.

이상과 같이 젖산균에 의해서 생산되는 항균물질 중 단백질성의 박테리오신에 관한 연구는 아주 활발히 진행되는 반면, 비 단백질성 항균물질에 관한 연구는 아직까지 활발히 진행되지 않고 있다. 특히, 락토바실러스 애시도필루스(Lb. acidophilus)가 생산하는 비 단백질성 항균물질에 관한 연구는 1970년대 중반의 애시돌린과 애시도필린에 관한 연구 이후의 보고는 없는 실정이며, 락토바실러스 애시도필루스가 생산하는 어떤 미지의 물질에 의한 병원성 미생물의 생육저해가 관찰되었으나, 이 물질에 관한 연구결과는 아직 보고되어 있지 않은 상태이다.

상술한 바와 같이, 인체내에서 다량으로 존재하는 젖산균에서 생산되는 항균물질은 무엇보다도 인체에 대한 독성이 극히 미미할 것으로 유추되므로, 젖산균으로 부터 독성이 적으며 넓은 항균범위를 가지는 항균물질을 생산하는 균주를 개발하려는 노력이 계속되었는 바, 특히, 상당한 연구가 이루어진 단백질성 항균물질에 비하여, 상대적으로 적용할 수 있는 범위는 넓지만 관련연구가 미비한 상태인 비 단백질성 항균물질을 생산하는 균주를 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 독성이 적으며 넓은 항균범위를 가지는 비 단백질성 항균물질을 생산하는 균주를 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 원유에서 분리된 신규한 락토바실러스 속의 미생물로 부터 넓은 범위의 항균활성을 나타내며, 독성이 적으면서도 넓은 범위의 미생물들에 대하여 항균활성을 가지는 신규한 비 단백질성 물질을 분리하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 주된 목적은 항균활성을 나타내는 신규한 락토바실러스 속 미생물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 전기 균주로부터 항균활성을 나타내는 물질을 효과적으로 분리, 정제하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 전기 균주로부터 분비되는 신규한 항균성 물질을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명자들은 원유로부터 유래되며 넓은 범위의 항균활성을 나타내는 미생물의 세균학적 성상을 분석하여 신규한 락토바실러스 속 균주로부터 항균활성을 나타내는 물질을 분리, 정제한 결과, 전기 미생물로 부터 생산되는 항균활성을 나타내는 물질이 넓은 온도범위와 넓은 pH범위에서 안정하고, 넓은 항균범위를 가지는 비 단백질성 물질임을 확인하였다.

이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

본 발명자들은 유아 분변, 분만도(vaginal track) 채취물, 소 위 내용물, 돼지 위 내용물, 소 장 내용물, 돼지 장 내용물, 부패과일, 원유, 채소류, 김치류 등에서 얻어진 7,399주의 미생물로부터 대장균(E. coli) O157:H7에 대하여 항균활성이 있는 항균물질 생산균주를 스크리닝하여 항균활성을 지닌 한 미생물을 선발하고, 전기 미생물의 균학적 성상을 분석한 결과, 락토바실러스(Lactobacillus) 속에 속하는 신규한 미생물임을 확인하였다. 이에, 전기 미생물을 '락토바실러스 속(Lactobacillus sp.) ME1'으로 명명하고, 2000년 3월 14일자로 사단법인 한국종균협회(KFCC)에 기탁번호 KFCC 11155로 기탁하였다.

또한, 락토바실러스 속(Lactobacillus sp.) ME1(KFCC 11155) 가 생산 및 분비하는 물질이 넓은 온도범위와 넓은 pH범위에서 안정하고, 190nm부근에서 최대 흡광도를 가지며 453Da의 분자량을 갖는 비 단백질성 항균물질로서, 애시돌린이나 애시도필린과 유사한 항균범위를 보이며, 단백질성 항균 물질인 박테리오신 보다는 넓은 항균범위를 보이는 신규한 항균물질임을 확인하고, 이를 'KHANIN-ME1'이라 명명하였다.

이하에서는, 락토바실러스 속(Lactobacillus sp.) ME1(KFCC 11155)으로 부터 KHANIN-ME1을 분리, 정제하는 방법을 이하의 공정에 따라 설명한다.

제 1공정: 메탄올 추출

락토바실러스 속(Lactobacillus sp.) ME1(KFCC 11155)을 배양한 배양물을 원심분리하여 상등액을 취하여 농축하고, 메탄올을 첨가하고 원심분리하여 상등액을 수득한 후, 다시 농축하여 조항균물질을 수득한다: 이때, 락토바실러스 속 ME1은 바람직하게는 MRS 액체배지를 사용하여 37℃에서 30 내지 40시간동안 배양하며, 상등액은 배양물을 10,000 x g에서 10 내지 20분간 원심분리하여 수득하고, 회전 진공 증발기를 이용하여 농축한다. 또한, 메탄올은 최초로 수득한 배양액과 바람직하게는 동일한 량을 첨가하고, 20 내지 40분동안 혼합한다.

제 2공정: 크로마토그래피

제 1공정에서 수득한 조항균물질은 이온교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography), 겔 여과 크로마토그래피(gel filtration), 및 박층 크로마토그래피(TLC)를 순서대로 수행하여 활성분획을 수득한다: 이때, 이온교환 크로마토그래피는 양이온 교환수지(CM Sepharose CL-6B)를 사용하고, 겔 여과 크로마토그래피는 겔 여과수지(Sephadex G-15)를 사용하는 것이 바람직하다.

제 3공정: 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)

제 2공정에서 수득한 활성분획을 고성능 액체 크로마토그래피에 적용하여 KHANIN-ME1를 정제한다: 이때, 고성능 액체 크로마토그래피는 역상 칼럼(reverse phase column)을 사용하는 것이 바람직하다.

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명하고자 한다.

이들 실시예는 단지 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이들 실시예에 의해 본 발명의 범위가 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자들에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 균주의 분리 및 동정

유아 분변, 분만도(vaginal track) 채취물, 소 위 내용물, 돼지 위 내용물, 소 장 내용물, 돼지 장 내용물, 부패과일, 원유, 채소류, 김치류 등에서 얻어진 2,683종의 시료로부터 7,399주의 미생물을 분리하여, 이 중 대장균(E. coli) 0157:H7에 대하여 항균활성이 있는 균주 40주를 선발하였다. 1차 선발된 균주 40주 중 통상 혐기성 세균이면서, 그람 양성(Gram +), 카탈라아제 음성(catalase -), 포자를 형성하지 않는 특성을 보이는 균주 7주를 2차 선발하고, 그 중 병원성 대장균 0157:H7에 가장 큰 항균활성을 보이는 원유에서 분리된 균주를 선발하였다. 이 때, 항균활성은 $1x10^{9}$ CFU/ml의 대장균(E. coli) 0157:H7(ATCC 35150)을 1%(v/v) 접종한 한천배지(nutrient agar plate)상에 직경 8mm의 페이퍼 디스크(paper disk, Adventec Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 올린 후, 균주 배양액을 80㎕ 떨어뜨리고 37℃에서 18시간 동안 배양하여 생성된 생육 저지환의 직경(mm)을 측정하였으며, 항균활성 단위는 상기 조건에서 생성된 생육 저지환의 면적에서 페이퍼 디스크의 면적을 뺀 면적이 $1mm^2$ 일 때를 1AU(arbitrary unit)로 하였다.

한편, 전기 선발된 균주의 균학적 성상을 분석한 결과, 그람 양성반응 및 카탈라아제 음성반응을 보이는 간균으로, 포자는 형성하지 않으며 운동성이 없음을 알 수 있었다. 또한, 에이피아이 50 씨에이치엘 키트(API 50 CHL kit, bioMerieux Co., France)와 에이피아이 50 씨에이치엘 데이터베이스(API 50 CHL database V4.0)를 이용하여, 전기 선발된 균주의 탄수화물 이용성을 알아내었다(참조: 표 1).

균주의 탄수화물 이용성

당의 종류	결과	당의 종류	결과
글리세롤(glycerol)	-	살리신(salicine)	+
에리트리올(erythritol)	-	셀로바이오스(cellobiose)	-
D-아라비노스(D-arabinose)	-	맥아당(maltose)	+
L-아라비노스(L-arabinose)	-	젖당(lactose)	+
리보스(ribose)	-	멜리바이오스(melibiose)	-
D-자일로스(D-xylose)	-	사카로스(saccharose)	+
L-자일로스(L-xylose)	-	트레할로스(trehalose)	+
아도니톨(adonitol)	-	이눌린(inulin)	-
β-메틸-D-자일로시드(β-methyl-D-xyloside)	-	b-젠티오바이오스(b-gentiobiose)	-
갈락토스(galactose)	+	D-라피노스(D-raffinose)	-
D-포도당(D-glucose)	+	아미돈(amidon)	-
D-과당(D-fructose)	+	글리코겐(glycogen)	-
D-만노스(D-mannose)	+	자일리톨(xylitol)	-
L-소르보스(L-sorbose)	-	멜레지토스(melezitose)	-
람노스(rhamnose)	-	D-투라노스(D-turanose)	-
둘시톨(dulcitol)	-	D-라이조스(D-lyxose)	-
이노시톨(inositol)	-	D-타가토스(D-tagatose)	-
마니톨(mannitol)	-	D-푸코스(D-fucose)	-
솔비톨(sorbitol)	-	L-푸코스(L-fucose)	-
아미그달린(amygdaline)	-	D-아라비톨(D-arabitol)	-
알부틴(arbutine)	-	L-아라비톨(L-arabitol)	-
N-아세틸-글루코스아민(N-acetyl-glucosamine)	+	글루코네이트(gluconate)	-
α-메틸-D-만노시드(α-methyl-D-mannoside)	-	2-케토-글루코네이트(2-keto-gluconate)	-
α-메틸-D-글루코시드(α-methyl-D-glucoside)	-	5-케토-글루코네이트(5-keto-gluconate)	-
에스쿨린(esculine)	+		

상기 실험결과를 통하여 선별된 균주는 갈락토스, 포도당, 과당, 만노스, N-아세틸-글루코스아민, 에스쿨린, 살리신, 맥아당, 젖당, 사카로스, 트레할로스 등의 탄수화물을 이용하며, 락토바실러스 애시도필루스의 탄수화물 이용도와 비교한 결과, 90.5%의 동질성을 보임을 알 수 있었다. 더욱이, 16S 소포체(ribosomal) RNA 분석으로 작성된 진화계통수로부터, 본 발명의 선별된 균주는 락토바실러스(Lactobacillus)속에 속하는 간균임이 판명되었다(참조: 도 1). 이에, 본 발명의 균주를 '락토바실러스 속(Lactobacillus sp.)ME1'으로 명명하고, 2000년 3월 14일자로 사단법인 한국종균협회(KFCC)에 기탁번호 KFCC 11155로 기탁하였다.

실시예 2: 항균물질의 정제

항균물질의 정제는 락토바실러스 속(Lactobacillus sp.) ME1(KFCC 11155)을 배양한 후 얻어지는 배양액을 메탄올로 추출하여 조항균물질을 수득하고, 수득한 조항균물질을 이온교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피 및 박층 크로마토그래피(TLC)에 순서대로 적용하여 활성분획을 수득하며, 수득한 활성분획을 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 적용하여 항균물질을 정제하였다.

실시예 2-1: 메탄올 추출

락토바실러스 속 ME1을 MRS 액체배지(Merck Co., Germany)에 2%(v/v)가 되게 접종한 후, 37℃에서 36시간동안 배양하여 얻어진 배양액을 10,000 x g에서 15분간 원심분리하여, 그 상등액 10ℓ를 회전 진공 증발기(rotary vacuum evaporator, EYELA, Japan)를 이용하여 농축하였다. 이어, 10ℓ의 메탄올을 첨가하여 30분 동안 혼합한 후, 10,000 x g에서 15분간 원심분리하고 상등액만을 취하였다. 전기한 추출 과정을 세번 반복하여 얻어진 메탄올 추출액을 모아 다시 회전 진공 증발기를 이용하여 농축하고, 1ℓ의 초산완충용액(50mM acetate buffer, pH 5.0)을 첨가하여

용해시킨 것을 조항균물질로 사용하였다.

실시예 2-2: 크로마토그래피

전기에서 수득한 조항균물질을 전기 초산완충용액으로 평형화시킨 양이온 교환수지(CM Sepharose CL-6B, Biorad., U.S.A.)가 충진된 칼럼(1.5 x 50cm)에 적용하였다. 용출시에는 염화나트륨 농도구배 용출용액 1.8L를 분당 0.4㎖의 속도로 통과시키며 4㎖씩 분획하였다. 각각의 분획으로 항균활성을 수행한 후, 항균활성이 있는 염화나트륨 농도 0.15-0.2M의 180㎖을 분리하여 수득하였다.

다음으로 겔 여과 크로마토그래피(gel filtration)을 수행하기 위하여, 전기 수득한 활성분획을 동결 건조시켜 동일 완충액 3㎖에 혼합한 후, 0.45㎛ 주사기용 여과기(syringe filter, Gelman Sciences, U.S.A.)로 여과하였다. 상기 여과된 시료를 겔 여과수지(Sephadex G-15, Biorad., U.S.A.)가 충진된 칼럼에 적용한 후, 전개용매로서 동일 완충용액을 분당 0.4㎖의 속도로 전개하여 활성분획을 수득하였다.

끝으로, 전기 수득한 활성분획을 박층 크로마토그래피에 적용하였다. 이때, 고정상으로는 실리카겔판(Silicagel 60 TLC plate)을 사용하며, 이동상으로는 부탄올, 메탄올 및 증류수가 4:1:2(v/v/v)로 혼합된 전개용매를 사용하였다. 전개 후 용매를 완전히 건조시키고, 254nm 파장의 자외선을 조사하여 분리된 성분(spot)을 확인하였다. 고정상에 분리된 각각의 성분을 모아서 메탄올로 추출하여 농축하고, 이를 0.5㎖의 증류수에 용해시킨 후, 각각의 항균활성을 측정하였다. 그 결과, Rf 0.37의 값을 갖는 활성분획을 수득하였다.

실시예 2-3: 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)

전기 박막 크로마토그래피로부터 수득한 활성분획을 고정상으로는 역상 칼럼 (reverse phase C18 column, 4.6 x 150mm, Jasco, Japan)을 사용하고, 이동상으로는 증류수를 사용한 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 적용하고, 유속을 분당 0.3㎖로 조절하였다. 그 결과, 나타나는 8개의 피크(peak) 중 2번째 피크의 분획에서 항균활성이 있음을 확인하고, 이를 'KHANIN-ME1'로 하였다.

실시예 3: KHANIN-ME1의 물리, 화학적 특성

실시예 3-1: 열안정성 및 pH안정성

항균물질의 열 안정성은 조항균물질을 25, 50, 70 및 100℃에서 1시간 동안 121℃에서 15분간 열처리한 후, 이의 항균활성을 측정함으로써 조사하였다(참조: 표 2).

처리온도별 항균물질의 활성

온도(℃)	활성도(AU)
25	163.3
50	157.7
70	177.6
100	163.5
121	157.7

또한, 항균물질의 pH 안정성은 각각 0.1N 염산과 수산화나트륨을 이용하여 pH 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12로 조절하고, 조항균물질을 400AU/ml씩 첨가하여 25℃에서 24시간 방치한 다음, 이의 항균활성을 측정함으로써 조사하였다(참조: 표 3).

처리 pH별 항균물질의 활성

pH	활성도(AU)
2	28.3
4	34.7
6	28.3
7	31.4
8	25.2
10	31.4
12	31.4

상기 표 2 및 3에서 보듯이, 본 발명의 항균물질은 모든 온도에서와 모든 pH범위에서 안정하였으며, 항균력의 소실이 거의 관찰되지 않았다. 이러한 사실을 알카리성에서는 안정하지 않다고 알려진 애시도필린 또는 pH 6.8 및 121℃에서 15분간의 열처리로 90%의 항균력이 소실된다고 알려진 니신(Nisin)과 비교하면, 본 발명의 KHANIN-ME1가 매우 안정한 물질임을 알 수 있었다.

실시예 3-2: 자외선 흡광도 조사

자외선-가시광선 분광광도계(UV-Visible recording spectrophotometer, Shimadzu, Japan)를 이용하여 정제된 항균물질에 190nm에서 300nm의 파장범위의 빛을 조사한 결과, 190nm 부근에서 최대 흡광도를 나타냄을 알 수 있었다.

실시예 3-3: 질량측정

실시예 2에서 정제된 항균물질을 증류수와 아세토니트릴(acetonitrile)이 1:1(v/v)의 비율로 혼합된 전개용매에 용해시킨 후, 질량분석기(Platform II LC-MS, Micromass, Manchester, U.K.)에 적용하여 분석한 결과, 453에서 모 피크(peak)를 나타내므로, 본 발명의 항균물질의 분자량은 약 453Da 정도인 것으로 추정되었다.

실시예 4: KHANIN-ME1의 생물학적 특성

실시예 4-1: KHANIN-ME1의 생산특성

락토바실러스 속(Lactobacillus sp.) ME1(KFCC 11155)을 배양한 배양액을 10,000 x g에서 15분간 원심분리하여 침전된 세포만을 모아 아세트산 완충용액 (50mM acetate buffer, pH 5.0)으로 3번 세척한 후, 비드-비터(Bead-Beater, Biospec, U.S.A.)를 이용하여 세포를 파괴하여 세포파괴액을 수득하였다. 수득한 세포 파괴액을 다시 원심분리하여 세포 추출여액과 세포 파편으로 분리하고, 세포 추출여액을 0.45㎛ 주사기용 여과기(syringe filter, Gelman Sciences, U.S.A.)로 여과한 후, 여과액의 항균활성을 측정하여 세포내의 항균물질 존재유무를 확인하였다.

또한, KHANIN-ME1이 세포막에 결합되어 있는지의 여부를 조사하기 위하여, 세포의 파편만을 취하고 100℃에서 30분 동안 열처리하여 살아 있는 세포를 사멸시킨 후, 이의 항균활성을 측정하였다(참조: 도 2). 도 2의 A 부분은 락토바실러스 속(Lactobacillus sp.) ME1(KFCC 11155)을 배양한 배양액의 상등액을 처리한 것이고, B 부분은 락토바실러스 속 ME1의 세포추출여액을 처리한 것이며, C 부분은 세포 파편을 처리한 것이다. 도 2에서 보듯이, 초기 세포 배양액의 상등액에서는 항균활성이 나타나는 반면, 세포 추출여액과 세포 파편에서는 항균활성이 나타나지 않았다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, 본 발명의 항균물질은 세포내에 축적되지 않으며, 세포막에 결합되어 존재하지도 않고 생합성된 후 세포 외부로 분비되는 물질로 추정되었다.

실시예 4-2: KHANIN-ME1의 항균범위

KHANIN-ME1의 항균범위를 조사하기 위하여, 그람양성 세균, 그람음성 세균, 곰팡이, 효모 등의 미생물에 대해서 항균활성을 측정하였다(참조: 표 4, 표 5).

그람 양성균에 대한 KHANIN-ME1의 항균성

그람 양성균(Gram positive strain)	결과
바실러스 서브틸러스(Bacillus subtilis,KCCM 35424)	-
락토바실러스 애시도필루스(Lactobacillus acidophilus,KCCM 32820)	+
락토바실러스 브레비스(Lactobacillus brevis,KCCM 40061)	+
락토바실러스 카세이(Lactobacillus casei,KCCM 35465)	+
락토바실러스 플랜타룸(Lactobacillus plantarum,KCCM 11322)	-
락토코커스 락티스 아종 락티스(Lactococcus lactissubsp.lactis,KCCM 32406)	-
류코노스톡 메센테로이데스(Leuconostoc mesenteroides,KCCM 11324)	-
리스테리아 모노사이토제네스(Listeria monocytogenes,KCCM 40307)	+
스태필로코커스 오레우스(Staphylococcus aureus,ATCC 25923)	+
스트렙토코커스 아갈락티아(Streptococcus agalactiae,KCCM 11957)	+
스트렙토코커스 피로제네스(Streptococcus pyrogenes,ATCC19615)	+

그람 음성균에 대한 KHANIN-ME1의 항균성

그람 음성균(Gram negative strain)	결과
대장균 O157:H7(Escherichia coliO157:H7, ATCC 35150)	+
슈도모나스 애루지노사(Pseudomonas aeruginosa, ATCC 27853)	+
살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium,ATCC 19585)	+
예르시니아 엔테로콜리티카(Yersinia enterocolitica,ATCC 27729)	+

상기의 표 4 내지 표 5에서 보듯이, 식중독 미생물인 대장균 O157:H7, 리스테리아 모노사이토제네스, 살모넬라 티피뮤리움, 스태필로코커스 아우레우스 및 예르시니아 엔테로콜리티카; 젖소의 유선염 유발 미생물인 스트렙토코커스 아갈락티아, 스트렙토코커스 피로제네스; 및, 식품위생 미생물인 슈도모나스 애루지노사에 대하여는 항균활성을 나타내어 이들의 생육을 억제하지만, 바실러스 서브틸러스, 락토바실러스 플랜타룸,류코노스톡 메센테로이데스 및, 락토코커스 락티스 아종 락티스의 생육은 억제하지 못하였다. 이상의 결과에서, 본 발명의 항균물질 KHANIN-ME1은 락토바실러스 애시도필루스가 생산하는 비 단백질성 물질인 애시돌린 또는 애시도필린이나, 락토바실러스 속 미생물이 생산하는 박테리오신보다 비교적 넓은 항균범위를 보였다.

실시예 4-4: 단백질 분해효소 내성

KHANIN-ME1의 단백질 분해효소에 대한 내성을 조사하기 위하여, 단백질분해효소 K(proteinase K, Sigma Chem. Co., U.S.A.)를 인산완충용액(50mM phosphate buffer, pH 7.0)에 ㎖당 35.1unit가 되도록 용해시킨 후, 조항균물질과 1:1(v/v)의 비율로 혼합하여 37℃에서 2시간 동안 반응시키고, 반응한 조항균물질의 항균활성을 측정하였다(참조: 도 3). 도 3의 A 부분은 단백질분해효소 K를 처리하지 않은 것이고, B 부분은 단백질분해효소 K를 처리한 것이다. 도 3에서 보듯이, 단백질분해효소 K를 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군과 비교하여 볼 때, 항균활성의 소실이 거의 관찰되지 않았으므로, 본 발명의 항균물질 KHANIN-ME1은 단백질성 물질이 아닌 것으로 판명되었다.

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 여러가지 미생물에 대하여 항균활성을 나타내는 락토바실러스 속 미생물, 이로부터 분비되는 신규한 비 단백질성 항균물질 및 전기 미생물로 부터 전기 항균물질을 정제하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의하면, 전기 생산균주로부터 생산되는 항균활성을 나타내는 물질이 단백질성 항균물질에 비하여 넓은 온도범위와 넓은 pH범위에서 안정하고, 넓은 항균범위를 나타내므로, 항균제 및 치료제 개발에 널리 활용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

항균활성을 나타내는 락토바실러스 속(Lactobacillus sp.)ME1(KFCC 11155).

청구항 2.

다음의 각 공정을 포함하는 비 단백질성 항균물질 KHANIN-ME1의 정제방법:

(ⅰ) 락토바실러스 속(Lactobacillus sp.)ME1(KFCC 11155)의 배양물을 원심분리하여 수득한 상등액의 농축물과 메탄올을 혼합한 후, 다시 원심분리하여 수득한 상등액을 농축하여 조항균물질을 수득하는 공정;

(ⅱ) 전기 조항균물질을 이온교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피 및 박층 크로마토그래피의 순서대로 적용하여 활성분획을 수득하는 공정; 및,

(ⅲ) 전기 수득한 활성분획을 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 적용하여 KHANIN-ME1를 정제하는 공정.

청구항 3.

제 2항의 방법에 의해 정제되며, 다음과 같은 특성을 가지는 비 단백질성 항균물질 KHANIN-ME1:

(ⅰ) 락토바실러스 속(Lactobacillus sp.)ME1(KFCC 11155)로부터 분비되며;

(ⅱ) 121℃, 15분간의 조건 및 pH 2 내지 12의 범위에서 안정하고;

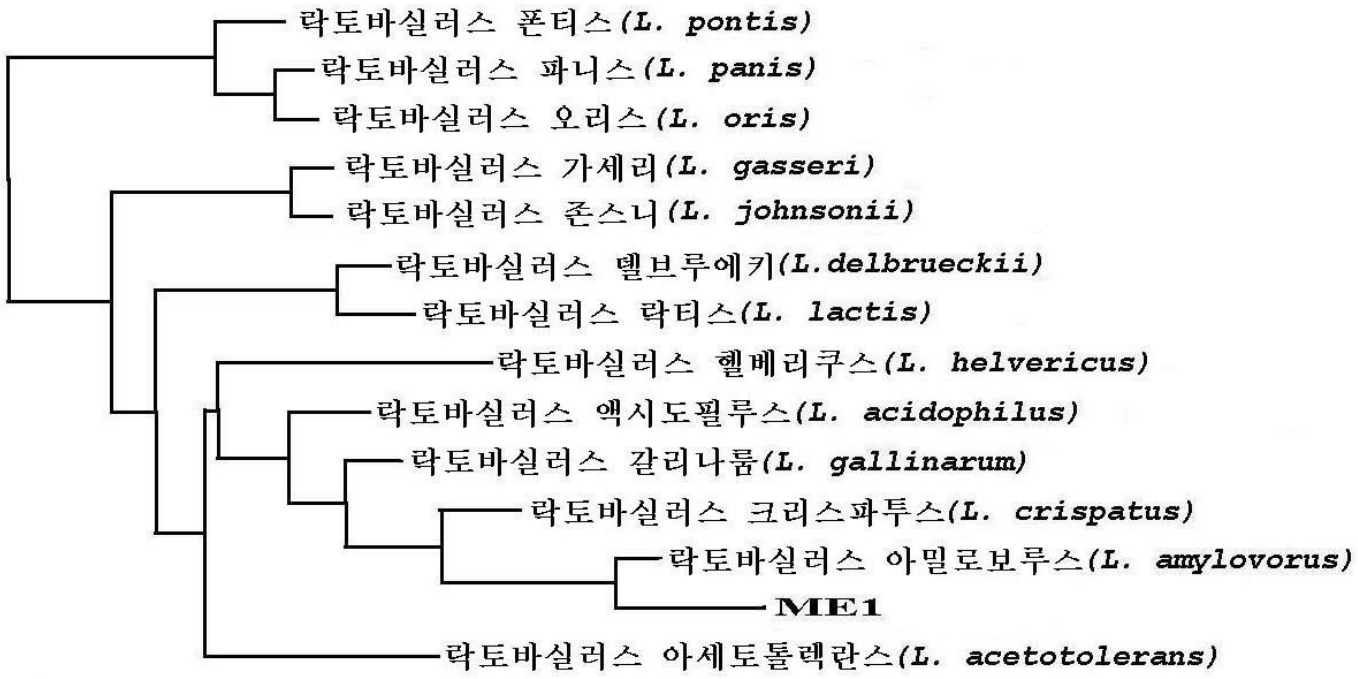
(ⅲ) 190nm부근에서 최대 흡광도를 가지며;

(ⅳ) 453Da의 분자량을 갖고; 및,

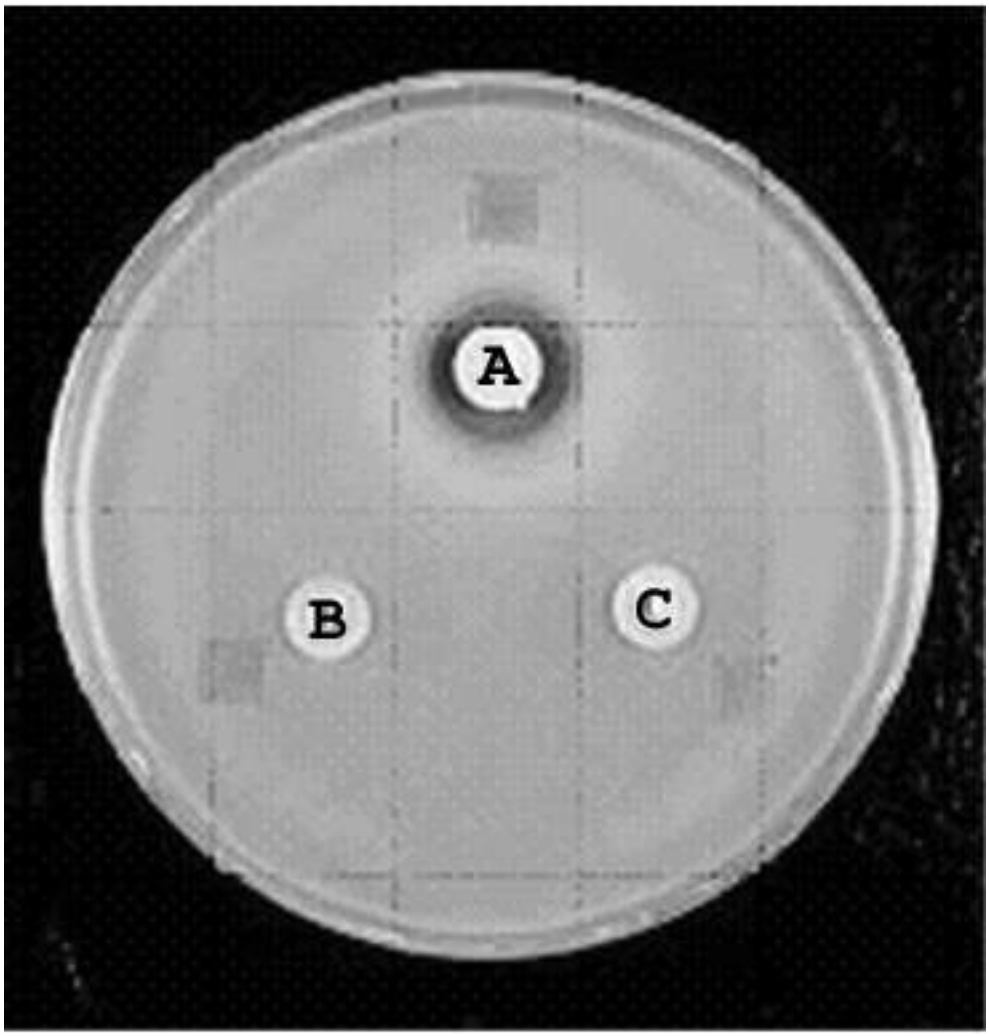
(ⅴ) 대장균(E. coli) O157:H7, 식중독 미생물인 리스테리아 모노사이토제네스(Listeria monocytogenes), 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium), 스태필로코커스 아레우스(Staphylococcus aureus), 예르시니아 엔테로콜리티카 (Yersinia enterocolitica), 젖소의 유선염 유발 미생물인 스트렙토코커스 아갈락티아(Streptococcus agalactiae), 스트렙토코커스 피로제네스(Streptococcus pyrogenes) 및 식품위생 미생물인 슈도모나스 애루지노사(Pseudomonas aeruginosa)에 대하여 항균활성을 갖는다.

도면

도면 1


락토바실러스 폰티스(L. pontis)
락토바실러스 파니스(L. panis)
락토바실러스 오리스(L. oris)
락토바실러스 가세리(L. gasseri)
락토바실러스 존스니(L. johnsonii)
락토바실러스 델브루에키(L.delbrueckii)
락토바실러스 락티스(L. lactis)
락토바실러스 헬베리쿠스(L. helvericus)
락토바실러스 액시도필루스(L. acidophilus)
락토바실러스 갈리나룸(L. gallinarum)
락토바실러스 크리스파투스(L. crispatus)
락토바실러스 아밀로보루스(L. amylovorus)
ME1
락토바실러스 아세토톨렉란스(L. acetotolerans)

도면 2



도면 3