

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. ⁶ C12N 1/14	(11) 공개번호 특 1998-056257	(43) 공개일자 1998년 09월 25일
(21) 출원번호	특 1996-075523	
(22) 출원일자	1996년 12월 28일	
(71) 출원인	한국과학기술연구원 박원훈	
(72) 발명자	서울특별시 성북구 하월곡동 39-1번지 김승호 대전광역시 유성구 가정동 236 KIT교수아파트 12동 204호 최용경 대전광역시 동구 용전동 신동아아파트 1동 203호 박나영 전라남도 여주시 문수동 51-4 배경숙 대전광역시 서구 둔산1동 크로바아파트 115동 1506호 오현우 대전광역시 유성구 궁동 다솔아파트 102동 204호	
(74) 대리인	이원희	

심사청구 : 있음

(54) 새로운 바실러스 리체니포미스(Bacillus licheniformis) 균주 및 본 균주가 생산하는 혈전 용해성 효소 단백질

요약

본 발명은 우리나라 전통의 발효식품인 된장에서 분리한 혈전 용해능을 가지는 새로운 바실러스 리체니포미스 DJ-3 (*Bacillus licheniformis* DJ-3) 균주 및 본 균주가 생산하는 혈전 용해성 효소 단백질에 관한 것으로, 상기 균주 및 효소 단백질을 유효 성분으로 하는 약학적 조성물은 경구로도 투여할 수 있어 혈전 관련 질환의 치료제 및 건강 보조 식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 1

명세서

[발명의명칭]
 새로운 바실러스 리체니포미스(*Bacillus licheniformis*) 균주 및 본 균주가 생산하는 혈전 용해성 효소 단백질

[도면의간단한설명]
 도 1은 본 발명의 균주 배양액(A)이 가지는 혈전 용해능을 피브린 플레이트 측정(fibrin plate assay) 방법으로 플라스민(B, 1 U/ml)의 혈전 용해능과 비교하여 나타낸 것이다.
 도 2는 본 발명의 균주 배양액에 포함된 혈전 용해성 효소 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 법으로 분석하여 나타낸 것이다.
 A : 표준 단백질, B : 효소 단백질

도 3은 본 발명의 균주가 가지는 지방산 조성을 가스 액체 크로마토그램 (gas-liquid chromatogram)으로 분석하여 나타낸 것이다.

[발명의상세한설명]
 [발명의목적]
 본 발명은 새로운 바실러스 리체니포미스 (*Bacillus licheniformis*) 균주 및 본 균주가 생산하는 혈전 용해능을 갖는 효소 단백질에 관한 것이다.

보다 상세하게는, 본 발명은 우리나라 전통의 발효식품인 된장에서 분리한 혈전 용해능이 탁월한 새로운 바실러스 리체니포미스 DJ-3 (*Bacillus licheniformis* DJ-3) 균주 및 본 균주가 생산하는 혈전 용해성 효소 단백질에 관한 것으로, 상기 균주 및 효소 단백질을 유효 성분으로 하는 약학적 조성물은 경구로도 투여할 수 있어 혈전 관련 질환의 치료제 및 건강 보조 식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

[발명이속하는기술분야및그분야의종래기술]

현대인이 사망하는 가장 큰 원인중의 하나가 심혈관 질환(cardiovascular disease)이라고 보고되어 있고, 구체적으로 심혈관 질환에는 심근 경색을 일으키는 관상동맥 질환(coronary artery thrombosis)과 뇌졸중 같은 발작을 유발하는 뇌혈관 질환(cerebrovascular thrombosis), 그리고 폐색전(pulmonary embolism)을 야기시키는 맥혈전증(venous thrombosis) 등이 포함된다. 현재 심혈관 질환은 그 발병율이 매년 증가하고 있으며, 우리 나라의 경우도 국민소득이 향상되고 식생활이 서구화됨에 따라 심장질환 등으로 사망하는 비율이 높아져 사망 원인중 1위를 차지하고 있다.

일반적으로 혈액은 혈관내에서는 유동성을 가지고 몸속을 순환하지만 일단 혈관밖으로 노출되어 나오면 급속히 응고된다. 혈관이 손상되면 출혈이 일어나게 되는데 보통 손상 받은 혈관이 동맥 등의 큰 혈관인 경우 수술로서 출혈을 막아야 하지만 작은 손상인 경우는 혈관에서 자연히 지혈된다.

이러한 혈관의 내부 표면은 내피세포로 둘러 싸여 있어, 이들 내피세포가 정상적인 경우에는 혈액의 응고를 억제하는 작용을 하고 손상이 일어난 경우에는 신속하게 지혈하는 작용을 한다. 혈관 내피세포가 항응고 활성(antithrombosis)을 갖는 이유는 그 표면이 혈소판의 표면과 같이 음전하를 띠고, 이들 세포에서 헤파란 설페이트(heparan sulfate) 또는 트롬보모듈린(thrombomodulin) 등과 같은 강력한 항혈액응고 인자가 분비되기 때문이다. 이 때 헤파란 설페이트는 안티트롬빈 III (antithrombin III)의 활성을 촉진시키고, 트롬보모듈린은 트롬빈의 효소 활성을 억제하는 동시에 프로테인 C (protein C)를 활성화하여 혈액의 응고를 방지한다.

또한 어떠한 요인에 의해 혈관이 손상되어 출혈이 일어나는 경우 생리적 방어기작으로 혈관내에 지혈 반응이 유발되어 혈액의 손실이 억제되는데, 먼저 혈액이 흘러 유출되는 것이 억제된 다음 혈액내에서 순환하는 혈소판이 모여서 점착하게 된다. 혈소판이 점착하여 응집하면 손상 부위에 플러그(plug)가 형성되고 손상된 혈관 주변의 내피세포와 혈소판의 작용으로 트롬빈이 혈액응고 경로를 통해 폭발적으로 생성된다. 생체내의 생리적 상태에서 지혈 현상은 반드시 손상된 혈관 주변에서만 제한적으로 일어나고 다른 부위에는 영향을 주지 않는다.

지혈 과정이 완전히 끝나 혈관 조직의 재생이 이루어지면 본 과정을 통해 형성된 피브린 폴리머(fibrin polymer)는 용해되어야 한다. 피브린 폴리머는 플라스민(plasmin)이라는 물질에 의해 용해되는데, 플라스민은 혈전 용해계에서 플라스미노겐(fibrinogen)이 활성화되어 생성된 것이다. 이와 같이 플라스민은 피브린을 용해하는 효소로 작용하지만 혈액 응고에 중요한 피브리노겐을 분해하는 활성도 가지고 있어 자유 플라스민이 지나치게 다량 존재하면 혈액 응고 작용이 전체적으로 억제되어 생체에 미치는 위험성이 크다. 이러한 문제를 극복하기 위해 혈액내에는 플라스민에 대한 억제인자가 존재하고, 플라스미노겐 활성화인자(plasminogen activator)에 의한 플라스미노겐의 활성화도 피브린 클롯(fibrin clot)이 형성된 곳에서만 일어나도록 플라스미노겐 활성화 억제인자(plasminogen activator inhibitor, PAI)가 정교하게 조절하고 있다.

생체 반응 기작에 의해 뇌혈관에 혈전이 생성되어 뇌혈전증이 일어나면 반신불수가 되고, 뇌의 미세한 혈관이 파열되어 뇌출혈이 일어나 뇌와 머리뼈 사이의 공간으로 출혈되는 거미줄막 출혈 등이 일어나면 생명에 치명적인 상태가 되며, 혈전에 의해 심장혈관이 막히면 심부전증이나 심장마비가 되므로 혈전(thrombus)을 치료하기 위한 많은 연구가 진행되어 왔다. 구체적으로 스트렙토키나제(streptokinase)와 유로키나제(urokinase) 같은 플라스미노겐 활성화인자가 혈전을 제거하는데 유용한 것으로 알려져 이들을 정맥주사하여 혈전 용해계(fibrinolytic system)를 활성화하는 치료법이 지난 30여년간 사용되어 왔다. 상기 두가지 약제는 실제로 혈전 용해에 상당히 효과가 있음이 많은 임상 예에서 이미 입증되었으나, 한편으로는 혈전에 대한 특이성이 없어 치료기간 동안에 전신출혈(systemic haemorrhage)이 일어나는 등의 부작용이 보고되어 있다.

이외에도 1987년에는 유전공학적 방법에 의해 tPA(tissue-type plasminogen activator)가 개발되었는데, 이는 혈전과 직접 결합할 수 있어 혈전에 대한 선택성이 높으므로 처음에는 이상적인 혈전 용해제로 인식되었다. 그러나 임상에서 실제로 사용한 결과, 혈액내 반감기가 6분 정도로 매우 짧아 사용하기가 불편하고 스트렙토키나제 또는 유로키나제를 투여한 경우에서와 같은 부작용이 여전히 나타나는 문제점이 있었다.

따라서, 최근에는 이들 기존의 혈전 용해제의 문제점을 극복하는 더 나은 혈전 용해제를 제공하기 위한 시도가 매우 활발히 진행되고 있다. 그 대표적인 것으로 첫번째는 혈전 용해 활성이 강한 새로운 변이형 활성화인자를 개발하는 것이며, 두번째는 자연 물질로부터 보다 우수한 혈전 용해능을 가지는 동물, 식물, 또는 미생물 유래의 새로운 혈전 용해제를 개발하는 것이다.

자연계의 여러 생물에서 존재하는 혈전을 용해할 수 있는 물질을 광범위한 탐색 기술을 활용하여 새로운 혈전 용해제로 개발할 수 있으므로 이러한 목적으로 수 많은 시도가 이루어졌다. 특히, 식물을 이용한 연구가 매우 활발하여 이미 TFPI(tissue factor pathway inhibitor)에 대한 많은 연구가 보고되어 있다. 구체적으로, 은행잎에서 추출한 성분이 혈류 순환을 원활하게 하는 것으로 알려져 이를 사용한 제제들이 개발되어 상품화되었다.

한편, 동물에서도 혈전을 용해하는 것으로 알려진 많은 물질이 존재한다고 보고되어 있다. 그 구체적인 예로 1989년 미국 머크(Merck)사 연구소에서 흡혈박쥐의 침샘조직에서 분리한 새로운 플라스미노겐 활성화인자(plasminogen activator) [Gardell, S. J. et al., (1991) Circulation 84, 244-253], 뱀독에서 분리한 살모나제(salmonase)[Chung, K. H. and Kim, D. S., (1991) Thromb. Haemost., 65, 953], 거머리에

서 분리한 헤멘틴(hementin), 그리고 지네에서 분리한 피브린 분해효소(fibrinolytic enzyme) [Kim, K. Y. et al., (1993) Thromb. Haemost., 69, 839] 등을 새로운 혈전 용해제로 보고한 바 있다.

또한, 미생물에서도 여러가지 혈전 용해 물질이 확인되었다. 그 대표적인 것으로 β -헤모리틱 스트렙토코커스(β -haemolytic streptococci)에서 분리된 스트렙토키나제(streptokinase)가 있으며 그 외에도 1948년에 보고된 스테필로코커스(*Staphylococcus*)에 존재하는 스테필로키나제(staphylokinase), 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)에서 발견된 CA-7, 브리노라제(brinolase), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*)에서 발견된 피브리노리신(fibrinolysin), 바실러스 속(*Bacillus sp.*) 균주에서 발견된 피브린 분해효소(fibrinolytic enzyme) 등이 혈전 용해제로 보고되어 있다.

현재까지 혈전증(thrombosis)의 치료에 널리 사용된 의약품인 스트렙토키나제(streptokinase), 유로키나제(urokinase) 그리고 tPA (tissue -type plasminogen activator) 등은 임상적으로 사용하기에 몇 가지의 문제점이 있었다. 구체적으로 상기 의약품은 우선 부작용의 위험이 크고, 가격이 매우 비쌌 뿐만 아니라, 유로키나제(urokinase)를 제외하고는 경구 투여가 불가능하다. 따라서, 최근에는 혈관 주사로만 투여할 수 있는 혈전 용해제 이외에 직접 경구 투여하거나 혈관 주사와 병용하여 혈액내의 혈전 용해능을 증가시킬 수 있는 제제에 관심이 모아지고 있다. 구체적으로 경구 투여할 수 있는 혈전 용해제로 지렁이(*Lumbricus tubellus*)에서 6가지의 혈전 용해성 효소가 분리되었다 [Nakajima, N. et al., (1993) Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1730; Mihara, H. et al., (1991) Jpn. J. physiol., 41, 461].

또한, 수미(Sumi) 등은 유로키나제를 장내에 투입하여 흡수시키면 혈액내의 혈전 용해능이 현저히 증가한다고 보고하였다. 즉, 이는 장에서 흡수된 유로키나제가 간으로 운반되어 혈전을 용해하는 효소의 합성을 촉진함으로써 혈전 용해능이 증가함을 나타내는 것으로, 혈전 용해성 효소가 장내에 직접 투여되어도 혈액내의 혈전을 용해시킬 수 있음을 확인해 준다 [Sumi, H. et al., (1985) Enzyme, 33, 121; Sumi, H. et al., (1983) Acta Haemat., 70, 289; Sumi, H. et al., (1980) Thromb. Res., 20, 711].

또한, 일본의 전통 발효 식품인 시오가라(shiokara)와 나토(natto)에서 혈전 용해성 효소가 존재함이 알려져 직접 그 효소가 분리되었는데, 그 중 나토로부터 분리한 나토키나제(nattokinase)라는 효소는 경구 투여하는 경우에도 생체내의 혈전 용해능을 높일 수 있다고 보고가 있어, 현재 일본에서 나토(natto)가 혈전 용해능을 지닌 건강식품으로 제품화되고 그 판매량이 급증하고 있다 [Sumi, H. et al., (1987) Experimentia, 43, 1110; 須見洋行 (1990) Bioindustry, 7, 725].

또한, 본 발명자들도 우리나라 전통의 발효 식품인 된장에서 분리한 바실러스 속 균주를 이용하여 다양한 혈전 용해성 효소 단백질을 정제하고 이를 포함하는 약학적 조성물을 경구로도 투여할 수 있는 혈전 관련 질환의 치료제 등으로서 이미 출원한 바 있다 (대한민국 특허출원 제 96-10045 호).

이에 더하여 본 발명자들은 우리나라의 전통 발효식품인 된장, 청국장, 간장, 김치 등에서 혈전 용해능이 탁월한 균주 및 혈전 용해성 효소를 발견하고자 계속 노력한 결과, 된장에서 혈전 용해능을 가지는 바실러스 리체니포미스 DJ-3 (*Bacillus licheniformis* DJ-3) 균주를 분리하고, 이로부터 혈전 용해능이 탁월한 효소 단백질을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[발명이이루고자하는기술적과제]

본 발명은 혈전 용해능을 가지는 새로운 바실러스 리체니포미스(*Bacillus licheniformis*) 균주를 제공함에 그 목적이 있다. 본 발명은 발효 식품인 우리나라 전통의 된장에서 분리한 바실러스 리체니포미스 균주를 제공한다.

구체적으로, 본 발명은 혈전 용해능이 가장 탁월한 새로운 바실러스 리체니포미스 DJ-3 균주를 선별하여 1996년 7월 20일에 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다 (수탁번호 : KCTC 0266 BP).

또한, 본 발명은 혈전 용해능이 탁월한 바실러스 리체니포미스 균주에서 생산되는 혈전 용해성 효소 단백질을 제공함에 그 목적이 있다.

구체적으로, 본 발명은 바실러스 리체니포미스 DJ-3 균주가 생산하는 혈전 용해성 효소 단백질로서 분자량이 각각 25,000 달톤 및 64,000 달톤인 효소 단백질을 제공한다.

또한, 본 발명은 혈전 용해능을 가지는 바실러스 리체니포미스 DJ-3 균주에서 생산되는 혈전 용해성 효소 단백질을 유효 성분으로 하는 혈전 관련 치료제용 약학적 조성물을 제공함에 그 목적이 있다.

구체적으로 본 발명의 약학적 조성물은 혈전 관련 질환인 관상동맥 질환, 맥혈전증 및 뇌혈관 질환 등을 진단하고 치료하는데 유용하게 사용될 수 있고, 이는 혈관 주사 뿐만 아니라 경구로도 투여될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 바실러스 리체니포미스 균주에서 생산되는 혈전 용해성 효소 단백질을 유효 성분으로 하는 건강 보조 식품을 제공함에 그 목적이 있다.

[발명의구성및작용]

본 발명은 혈전 용해능을 가지는 새로운 바실러스 리체니포미스(*Bacillus licheniformis*) 균주를 제공한다.

본 발명은 혈전 용해능을 가지는 균주를 분리하기 위하여, 우리나라 전통 발효식품인 된장을 수집하여 이를 적당한 배지에 도말하여 단일 균락(colony)을 이루는 균주를 선별한 다음 피브린 플레이트 측정 방법 등으로 각 균주의 혈전 용해능을 확인한다 (도 1 참조).

상기의 과정으로 분리한 본 발명의 균주를 동정하기 위하여, 본 균주를 배양한 다음 주사전자현미경(scanning electron microscope) 및 위상차현미경 등을 이용하여 그 형태적 특징을 관찰하고, 이를 다시 그람 염색하거나 지방산 조성 등을 분석하여 그의 배양·생리학적 특징을 조사한다.

그 결과 상기 균주는 간균 형태이며 타원형의 포자를 가지고 있고 하기의 특징을 나타냄을 확인한다. 일반적으로 지질은 세균의 세포막과 세포벽의 주요한 구성 인자로 장쇄 지방산을 포함하고 있으며 그 조성은 각각의 세균이 지닌 지방산 생합성계에 따라 특징이 있다. 세균의 장쇄 지방산 조성은 각 균주에서 매우 다양하게 나타나므로 지방산 조성은 분류학상의 단위로서 중 수준에서 균주를 확실하게 분류할 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 균주의 지방산 조성을 가스-액체 크로마토그램(gas-liquid chromatogram)으로 분석한다 (표 1 및 도 3 참조). 그 결과, 본 균주에 존재하는 측쇄사슬은 이소탄소(iso-Cn)과 안티이소 탄소(anteiso-Cn)가 대부분이고, 측쇄 사슬의 전체 조성상으로 본 균주는 바실러스 속(*Bacillus sp.*) 균주임을 확인한다 [Kaneda, T., (1967) J. Bacterio., 93, 894-903 ; Kaneda, T., (1977) B. Review, 41, 391-428 ; Rasoamananjaka, D. et al., (1985) J. Gen. Microbiol., 132, 2723-2732].

또한, 그외 본 발명의 균주를 동정하는데 필요한 모든 실험은 버거씨의 조직적 세포 분류법에 의한 방법에 따른다 [Peter H. A. Sneath, Endosporeforming Gram-positive Rods and Cocci Bergey's Manual of systematic Bacteriology, Vol. 2, 1104-1137 (1986)].

따라서 본 발명의 균주는 형태학적으로 바실러스 속 미생물의 일반적인 특징을 보이고, 최적 배지에서 그람 염색을 실시한 결과 그람 양성 세균으로 확인된다. 상기의 특징과 세포벽의 지방산 조성을 분석한 결과, 본 발명의 균주가 일반적인 바실러스 속 균주와는 달리 혈전 형성에 관여하는 피브리노겐을 강력하게 분해하는 효소 단백질을 생산하는 독특하고도 유용한 특성을 가지고 있음을 확인한다.

따라서, 본 발명의 균주를 새로운 바실러스 리체니포미스 (*Bacillus licheniformis*)의 변종으로 동정하고, 바실러스 리체니포미스 DJ-3 으로 명명하였으며, 1996년 7월 20일에 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다 (수탁번호 : KCTC 0266 BP).

또한, 본 발명은 상기 균주가 생산하는 혈전 용해성 효소 단백질을 제공한다. 구체적으로 본 발명의 바실러스 리체니포미스 DJ-3 균주를 트립틱 소이 액체 배지(tryptic soy broth medium) 등에 배양한 다음 원심 분리하여 그 배양 상등액을 얻는다. 상기 배양 상등액을 이용하여 혈전 용해성 효소의 활성을 측정하고 이로부터 상기 균주가 분비하는 효소 단백질을 확인한다 (도 2 참조). 또한, 각 균주의 피브리노겐 플레이트 용해 면적을 측정함으로써 혈전 용해의 우수성을 비교하고 이 때 대조균으로 잘 알려진 혈전 용해제인 1 U/ml 플라스민(plasmin)을 사용한다. 본 발명의 효소 단백질은 비교 사용한 플라스민 보다 1.5 배 높은 혈전 용해능을 나타낸다 (도 1 참조).

상기 혈전 용해능을 갖는 효소 단백질의 특성을 조사하기 위해, 배양 상등액에 암모늄 설페이트를 처리하여 침전물을 얻고 이를 이용하여 DEAE-세파실 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 새로운 혈전 용해성 효소 단백질을 분리·정제한다. 그 결과, 탁월한 혈전 용해능을 가지는 분자량이 각각 25,000 달톤 및 64,000 달톤인 혈전 용해성 효소 단백질을 확인한다.

본 발명의 효소 단백질이 임상적으로 사용될 수 있는지를 확인하기 위하여, 그의 용혈 활성(hemolytic activity)을 조사한다. 그 결과 상기 효소 단백질을 생산하는 바실러스 리체니포미스 균주는 전혀 용혈 활성을 나타내지 않음을 확인한다.

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.

하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

실시예 1 혈전 용해능을 가지는 균주의 분리

우리나라 유성, 광주, 논산 그리고 서울 등지의 지역에서 수집한 전통 된장에서 시료를 한 백김이씩 취하여 평판 희석 배양 방법으로 트립틱 소이 아가 배지(tryptic soy agar medium) (17 g/l 박토 트립톤, 3 g/l 박토소이톤, 2.5 g/l 박토 덱스트로스, 5g/l 염화나트륨, 2.5g/l 인산중칼륨, 20 g/l 박토 아가)에 도말하고 37°C에서 24시간 동안 배양하여 단일 균락을 선별하였다. 이렇게 선별한 균주를 각각 사용하여 피브리노겐 플레이트(fibrin plate) 측정법을 하기의 과정으로 수행함으로써 본 발명의 균주가 나타내는 혈전 용해능을 확인하고 그 중 탁월한 혈전 용해능을 갖는 균주를 선별하였다.

본 발명은 피브리노겐 플레이트 측정 방법으로 균주를 선별하기 위하여, 먼저 50mM 인산 완충용액(pH 7.4)으로 피브리노겐(fibrinogen)의 최종 농도가 1% 되도록 완전히 용해시킨 용액 5ml을 준비하고 여기에 트립틱 소이 아가 배지 5ml를 혼합하였다. 이 용액에 100 NIH U/ml 농도의 트롬빈 용액 0.1ml를 다시 첨가하여 혼합한 다음 트립틱 소이 아가 배지 15ml를 첨가하여 미리 고화시킨 페트리 디쉬(petri dish) 위에 붓고 실온에서 5 내지 10 분간 방치하여 고화시켰다. 여기에 상기에서 분리한 균주를 접종하고 37°C에서 24시간 동안 배양한 다음 15% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid)를 부가하여 생성되는 투명환(clear zone)을 확인하였다.

상기 과정에서 분리한 넓은 투명환을 가지는 균주를 바실러스 리체니포미스 DJ-3 (*Bacillus licheniformis* DJ-3) 이라고 명명하고, 본 균주를 1996년 7월 20일에 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다 (수탁번호 : KCTC 0266 BP).

실시예 2 전자 현미경적 관찰

본 발명에서 분리한 균주의 형태를 관찰하기 위하여, 실시예 1 에서 얻은 균주를 트립틱 소이 액체 배지(tryptic soy broth medium, 17 g/l 박토 트립톤, 3 g/l 박토 소이톤, 2.5 g/l 박토 덱스트로스, 5 g/l 염화나트륨, 2.5 g/l 인산중칼륨)로 37°C에서 24시간 동안 배양한 다음 원심 분리하여 균체를 회수하여 고정하였다. 이를 주사전자현미경 (scanning electron microscope)을 이용하여 8,400 배율로 촬영하여 균주의 형태를 관찰하였다.

실시예 3 균주의 지방산 분석

실시예 1에서 분리한 본 균주를 동정할 수 있도록 그의 지방산 조성을 가스-액체 크로마토그램(gas-liquid chromatogram)으로 분석하여 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[표 1]

미디 도스 시스템

RT	면적	Ar /Ht	반응ECL	이름	
1.457	581557248 0.031 · · · 7.033 용매피크				
1.785	2024 0.023 · · · 7.757 · · ·				
1.895	808 0.037 · · · 8.000 · · ·				
1.979	544 0.025 · · · 8.186 · · ·				
6.137	1488 0.036 0.998 13.618 14:0 이소				
6.130	984 0.039 0.986 14.000 14:0				

7.544	58168
7.675	60289 0.989 0.967 14:71 이소 15:0 안트 이소
9.100	9048 0.041 0.947 15.625 16:0 이소
9.310	832 0.042 0.945 15.756 16:1 w11c
9.698	7328 0.042 0.941 15.999 16:0
10.347	1200 0.047 0.935 16.386 이소 17:1 w10c
10.499	1048 0.047 0.933 16.476 5의 합

10.756	19728																																
10.912	29008 0:044 0:045 06:029 19:720이소 17:0 안트이소																																
*****	1048 . . 5의 합																																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>용매 면적</th> <th>전 면적</th> <th>표시 면적%표시 면적</th> <th>전체량</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>581557248</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>195112</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>195112</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>100.00</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>186589</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4"> TSBA [Rev 3.90] Bacillus 0.771 B. licheniformis 0.771 (Bacillus subtilis 그룹) </td> </tr> <tr> <td colspan="4"> TSBA와 비교[Rev 3.90] : Bacillus licheniformis (Bacillus subtilis 그룹) 거리: 2.560 </td> </tr> </tbody> </table>		용매 면적	전 면적	표시 면적%표시 면적	전체량	581557248				195112				195112				100.00				186589				TSBA [Rev 3.90] Bacillus 0.771 B. licheniformis 0.771 (Bacillus subtilis 그룹)				TSBA와 비교[Rev 3.90] : Bacillus licheniformis (Bacillus subtilis 그룹) 거리: 2.560			
용매 면적	전 면적	표시 면적%표시 면적	전체량																														
581557248																																	
195112																																	
195112																																	
100.00																																	
186589																																	
TSBA [Rev 3.90] Bacillus 0.771 B. licheniformis 0.771 (Bacillus subtilis 그룹)																																	
TSBA와 비교[Rev 3.90] : Bacillus licheniformis (Bacillus subtilis 그룹) 거리: 2.560																																	
<table border="1"> <tr> <td></td> <td>0</td> <td>5</td> <td></td> <td>20</td> <td>25</td> <td>30</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>40</td> </tr> </table>			0	5		20	25	30	35								40																
	0	5		20	25	30	35																										
							40																										
<p>.</p>																																	

<p>16.00이소</p> <p>· x+-</p> <p>· .</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p>	<p>·</p>							
<p>16:1w11c</p> <p>x+-</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p>	<p>·</p> <p>·</p>							
<p>16:0</p> <p>· x+-</p> <p>· .</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p>	<p>·</p>							
<p>이소 17:1w10c</p> <p>· x+-</p> <p>· .</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p>	<p>·</p>							
<p>17:0이소</p> <p>17:0안트이소</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>---+x-- .</p> <p>---x+---</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p> <p>·</p>	<p>·</p>							
<p>5의 합</p>	<p>-*-</p>	<p>·</p>	<p>13-10</p>	<p>·</p>	<p>·</p>	<p>·</p>	<p>·</p>	<p>·</p>

상기 표 1 에서 알 수 있는 바와 같이 본 규주에 존재하는 측쇄사슬은 이소 탄소(iso-Cn)과 안트이소 탄

14 내지 17 이면 그룹 A (*B. alvei*, *B. brevis*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. marcerans*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*)에 속한다고 한다. 본 발명의 결과와 비교했을 때 지방산 조성의 함량에 있어서는 안티소-C₁₅ 산(anteiso-C₁₅ acid)과 이소-C₁₅ 산(iso-C₁₅ acid)이 각각 34.34%와 30.21%로 그룹 A에 속했지만 지방산의 길이에 있어서는 C₁₂와 C₁₈이 각각 0.8%와 9.85%로 소량 존재하여 차이가 있으므로 이를 세갈(Sehgal) 등의 보고를 통해 박테리아에서 현저하게 나타나는 지방산의 조성 분류에 있어 중요한 인자라고 보고 해결하였다 [Sehgal, S. N. et al., (1962) Can. J. Biochem. Physiol., 40, 69-81]. 따라서 세포벽 지방산의 프로파일은 준비된 미디시스템 [Microbio. Identification System Clin. Microbiol. Rev., 5(3), 302-327 (1992)]의 라이브러리와 비교 분석한 결과 본 발명의 균주는 가네다의 지방산 분류 그룹(A~F)중에서 그룹 A에 가장 가까운 균주임을 알 수 있었다.

실시예 4 혈전 용해능을 가지는 효소 단백질의 확인

실시예 1에서 선별한 각 균주가 생산하는 혈전 용해성 효소 단백질의 혈전 용해능을 확인하기 위하여, 선별된 균주들은 트립틱 소이 액체 배지(tryptic soy broth medium)를 사용하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 이들 배양액을 원심 분리하여 균체를 제거하고 그 배양 상등액을 사용하여 혈전 용해성 효소의 활성 측정방법에 따라 그 활성을 측정하였다.

실시예 1에서 서술한 피브리린 플레이트 측정 방법과 동일하게 피브리린 플레이트를 제조한 다음 본 플레이트 위에 페이퍼 디스크(paper disc)를 놓았다. 각 시료를 각각 100 µl씩 취하여 페이퍼 디스크 위에 주입하고 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 다음 피브리린 플레이트의 용해 면적을 측정하였다. 대조군으로서 혈전 용해성 효소로서 잘 알려진 정제된 플라스민(plasmin) 1 U/ml을 사용하였다. 그 결과, 본 발명의 효소 단백질은 비교군으로 사용한 플라스민 보다 1.5배 높은 혈전 용해능을 나타냄을 확인한다.

실시예 5 혈전 용해능을 가지는 효소 단백질의 분리·정제

본 발명의 혈전 용해능을 가지는 효소 단백질을 분리하기 위하여, 실시예 1에서 얻은 균주의 배양액을 10,000xg에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취하고 여기에 30~80%에 해당되는 암모늄 설페이트를 처리하였다. 이렇게 얻어진 단백질 침전물을 탈염시킨 다음 DEAE-세파실(DEAE-Sephacel) 컬럼(시그마제 품, 미국)을 통과시켜 혈전 용해능을 갖는 새로운 단백질을 분리·정제하고 분리된 효소의 특성을 조사하였다.

표준 단백질과 동시에 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동을 실시하였고 그 각각의 활성을 측정한 결과, 분자량이 각각 25,000 및 64,000 달톤인 단백질들을 분리·정제하였다 (도 2 참조).

실시예 6 용혈 활성 측정

본 발명의 균주가 생산하는 새로운 효소 단백질을 의약품 혹은 식품산업에 응용할 경우의 유용성을 확인하기 위하여, 본 균주에 용혈 활성(hemolytic activity)이 있는지를 조사하였다. 실시예 1에서 선별한 바실러스 리체니포미스 DJ-3 (*Bacillus licheniformis* DJ-3) 균주를 플레이트에 놓고 여기에 사람의 혈액을 첨가하여 배양한 다음 현미경으로 관찰한 결과 혈액이 분해되지 않고 그대로 유지되는 것으로 보아 본 발명의 균주는 전혀 용혈 활성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

[발명의효과]

본 발명의 바실러스 리체니포미스 DJ-3 균주가 생산하는 혈전 용해성 효소 단백질은 기존의 혈전 용해제인 플라스민 보다 1.5배 이상의 혈전 용해능이 있어 이를 유효 성분으로 하는 약학적 조성물은 혈전 관련 질환인 관상동맥 질환, 맥혈전증 및 뇌혈관 질환 등을 진단하고 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 기존의 혈전 용해제가 주로 정맥 주사를 통해 투여되는 것과 비교할 때 본 발명의 혈전 용해성 효소 단백질은 혈관 주사 뿐만 아니라 경구로도 투여될 수 있으므로 혈관 주사제와 병용하여 사용할 수 있는 탁월한 잇점이 있다. 따라서 임상적으로 경구 투여 약제로 개발될 수 있을 뿐만 아니라 건강 보조 식품으로도 개발될 수 있다. 또한, 본 발명의 바실러스 리체니포미스 균주는 용혈 활성을 전혀 나타내지 않으므로 임상적으로 사용하는 것이 용이하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

혈전 용해능을 갖는 새로운 바실러스 리체니포미스(*Bacillus licheniformis*) 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 발효 식품에 존재하는 것을 특징으로 하는 바실러스 리체니포미스 균주.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 발효 식품인 된장에서 분리한 바실러스 리체니포미스 DJ-3 균주 (수탁 번호 : KCTC 0266 BP).

청구항 4

제 1 항의 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주가 생산하는 혈전 용해능을 갖는 효소 단백질.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 단백질은 분자량이 25,000 달톤인 것을 특징으로 하는 효소 단백질.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 단백질은 분자량이 64,000 달톤인 것을 특징으로 하는 효소 단백질.

청구항 7

제 4 항의 효소 단백질의 일부 또는 전부를 유효 성분으로 하는 혈전 관련 질환 치료제용 약학적 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 혈전 관련 질환은 관상동맥 질환, 맥혈전증 및 뇌혈관 질환을 포함하는 것을 특징으로 하는 혈전 관련 치료제용 약학적 조성물.

청구항 9

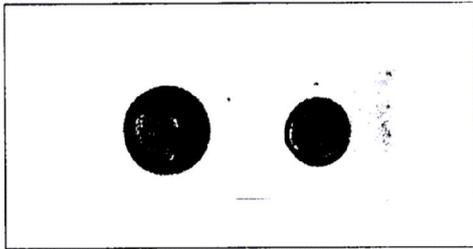
제 7 항에 있어서, 경구로 투여할 수 있는 혈전 관련 치료제용 약학적 조성물.

청구항 10

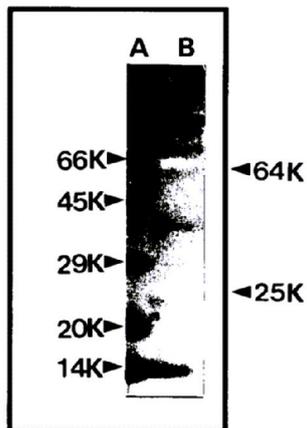
제 4 항의 효소 단백질의 일부 또는 전부를 유효 성분으로 하는 건강 보조 식품.

도면

도면1



도면2



도면3

