



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1200333 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2011-0129087 호
	출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD)	2011년 12월 05일
	등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)	2012년 11월 06일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)
 내열성 엔돌라이신 L y s B P S 1 3, 이를 포함하는 식품 및 사료 조성물

특허권자 (PATENTEE)
 서울대학교산학협력단(114371-0*****)
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

발명자 (INVENTOR)
 등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록 되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2012년 11월 06일



특 허 청
 COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



연차등록료 납부일은 설정등록일 이후 4년차부터 매년 11월 06일까지이며 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 0462-20110003
부처명 교육과학기술부
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 박테리오파지를 이용한 병원세균 제어와 항생제 대체
주관기관 서울대학교
연구기간 2009.05.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 엔돌라이신 LysBPS13.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 서열번호 2의 아미노산 서열은,

서열번호 1의 핵산 서열로 암호화되는 것을 특징으로 하는 엔돌라이신 LysBPS13.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 엔돌라이신 LysBPS13은,

바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 감염 박테리오파지 BPS13 (KCTC 12061BP) 유래인 것을 특징으로 하는 엔돌라이신 LysBPS13.

청구항 4

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 엔돌라이신 LysBPS13을 함유하는 식품 첨가제.

청구항 5

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 엔돌라이신 LysBPS13을 함유하는 식품 조성물.

청구항 6

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 엔돌라이신 LysBPS13을 함유하는 사료 첨가제.

청구항 7

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 엔돌라이신 LysBPS13을 함유하는 사료 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 박테리오파지 유래의 엔돌라이신에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 내열성 특징이 있는 엔돌라이신 LysBPS13에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 엔돌라이신(endolysin)은 박테리오파지(또는, 세균 바이러스)에 의해 인코딩되는 펩티도글리칸 가수분

해효소인데, 파지증식의 용균 사이클에서 후기 유전자 발현 동안 합성되며, 박테리아 펩티도글리칸의 분해를 통해 감염된 세포로부터 파생(progeny) 비리온의 방출을 매개한다.

[0003] 엔돌라이신은 $\beta(1,4)$ -글리코실라제(리소자임), 트랜스글리코실라제, 아마미다제 또는 엔도펩티다제의 활성을 보여 항균의 용도로 활용될 수 있는데, 항생물질의 성공과 우월함 때문에 그동안 실제 적용은 활성화되지 못하였다.

[0004] 그런데, 다수의 항생물질에 내성을 보이는 세균들의 출현 이후, 엔돌라이신은 새롭게 주목받으며, 인간 감염 병원균의 방지 수단으로 많은 관심이 쏠리고 있다.

[0005] 엔돌라이신은 '효소'와 '항생물질'의 혼성 용어인 '엔지바이오틱스(enzybiotics)'로도 사용되는데, 2001년에 피세티(Fischetti)와 그의 동료들은 처음으로 박테리오파지 C1 엔돌라이신의 치료적 효능을 입증하였다(Nelson et al., 2001).

[0006] 그 후, 다수의 문헌에서, 특히 그람 양성균에 의한 세균 감염에 대한 대안으로 엔돌라이신이 연구되었다. 스트렙토코쿠스 뉴모니애(Loeffler et al., 2001), 바실러스 안트라시스(Schuch et al., 2002) 및 스타필로코쿠스 아우레우스(Rashel et al, 2007)와 같은 그람 양성 병원균에 대한 다양한 엔돌라이신이 엔지바이오틱스로서 효능이 입증되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 특허출원번호 제10-2007-0095643호에는 "살모넬라 엔테리티디스 감염 박테리오파지로부터 선별된 살모넬라 특이적 사멸능을 갖는 신규한 박테리오파지"가 기재되어 있고, 미국 특허출원번호 12/999,840호에는 "그람 음성균의 세포벽의 펩티도글리칸을 분해하기 위한 방법으로, 프로모터를 포함하는 핵산을 박테리아에 주입하고, 단백질을 암호화하여 엔돌라이신이 세포벽의 펩티도글리칸을 분해하도록 하는 방법"이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명에서는 박테리오파지 유래의 신규의 엔돌라이신을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 엔돌라이신 LysBPS13을 제공한다.

[0010] 본 발명에서 새롭게 분리한 엔돌라이신 LysBPS13은 식중독의 원인균 중 하나인 바실러스 속 및 외막의 투과성을 높인 살모넬라와 대장균에 대해 특이적인 용균 작용을 보인다.

[0011] 또한, 본 발명의 엔돌라이신 LysBPS13은 아마미다제(amidase)의 활성을 가지며, pH 7.5~10.5에서 항균 활성을 보인다. 특히 열(100℃)을 가했을 때도 안정적인 항균활성을 보이는데, 42~45℃에서 최적의 활성을 나타낸다.

[0012] 한편, 본 발명에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 서열은 바람직하게 서열번호 1의 핵산 서열로 암호화되는 것이 좋다.

[0013] 한편, 본 발명의 엔돌라이신 LysBPS13는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 감염 박테리오파지 BPS13 (KCTC 12061BP) 유래인 것일 수 있다.

[0014] 한편, 본 발명은 상기 엔돌라이신 LysBPS13을 함유하는 식품 첨가제 또는 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품 첨가제 또는 식품 조성물은 엔돌라이신 LysBPS13을 함유하기만 하면 그 제형에 특별히 국한되지 않으나, 대상

식품은 바실러스 속이나 살모넬라 속 또는 대장균에 의해 오염되기 쉬운 식품이면 더욱 바람직하다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 엔돌라이신 LysBPS13을 함유하는 사료 첨가제 또는 사료 조성물을 제공한다. 상기 사료 첨가제 또는 사료 조성물은 엔돌라이신 LysBPS13을 함유하기만 하면 그 제형에 국한되지는 않으나, 바실러스 속이나 살모넬라 속 또는 대장균에 감염되기 쉬운 가축을 대상으로 하는 사료 첨가제 또는 사료이면 더욱 바람직하다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에서 새롭게 분리한 엔돌라이신 LysBPS13은 식중독을 일으키는 원인균 중 하나인 바실러스 속 균주들과 외막의 투과성을 높인(EDTA 처리) 살모넬라와 대장균에 대해 특이적인 용균작용을 보이고, 특히 글리세롤을 포함한 효소 저장 버퍼에 희석해 열(100 ℃)을 가했을 때도 안정적인 항균활성을 보이기 때문에 식품, 의약 및 동물 의약 산업 등에 활용될 수 있다.

[0017]

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 LysBPS13의 아미노산 서열 중 기능을 갖는 두 개의 보존 영역(conserved domain: PGRP, SH3_5)을 나타낸 것이다.

도 2는 정제된 엔돌라이신 LysBPS13의 SDS-PAGE 겔 사진 (A)과 LysBPS13에 의한 바실러스 세레우스 ATCC 10876 (지시균)의 흡광도 변화 (B)를 보여준다.

도 3은 여러 가지 온도에서 보관한 후, LysBPS13의 항균 활성 변화를 보여준다.

도 4는 LysBPS13의 아미다제 활성을 보여주는 것으로, 바실러스 세레우스 ATCC 10876에서 추출한 펩티도글리칸에 LysBPS13을 처리한 후, 무람산(muramic acid)의 증가량을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[실시예 1: 엔돌라이신 LysBPS13의 DNA, 아미노산 서열 분석 및 분리?정제]

[0021] 도양으로부터 분리한 박테리오파지 BPS13의 유전자서열을 분석한 뒤, BlastP (Marchler-Bauer, A., et al., 2011)를 통해, 바실러스 박테리오파지 TP21-L의 N-아세틸무라밀-L-알라닌 아미다제(N-acetylmuramyl-L-alanine amidase)와 매우 높은 유사성을 보이는 834 염기쌍의 열린해독틀(open reading frame)을 찾아내고, 이를 LysBPS13이라 명명하였다.

[0022] 분석 결과, LysBPS13은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는데, 특성이 잘 알려진 N-아세틸무라밀-L-알라닌 아미다제로, PlyCA(AAP42310.2), Ply511(CAA59368.1), T7 리소자임(AAB32819.1) 과는 다른 아미노산 서열을 가지고 있었다.

[0023] 보존 영역(Conserved domain)을 분석한 결과, 아미다제 활성을 갖는 펩티도글리칸 인식 단백질(peptidoglycan recognition protein)과 세포에 부착하는 기능을 갖은 SH3_5 슈퍼패밀리(superfamily)를 포함하고 있었다(도 1).

[실시예 2: 엔돌라이신 LysBPS13의 생화학적 특성 분석]

[0025] LysBPS13 단백질을 정제(도 2의 A)한 후, 항균활성을 측정하였는데, pH 7.5부터 pH 10.5 사이에서 항균 활성이 나타났으며, pH 9.5에서 가장 강한 활성(용해능, lytic activity)을 보였다.

[0026] 또한, 5 µg/ml의 소량으로도 바실러스 세레우스 ATCC 10876을 10분 안에 용해시켜 흡광도가 감소하는 것을 볼 수 있었다(도 2의 B).

[0027] 항균활성은 넓은 범위의 온도에서 안정하게 나타났으며, 그 중 최적온도는 42℃와 45℃ 사이였다.

[0028] [실시예 3: 엔돌라이신 LysBPS13의 항균 활성 범위]

[0029] 하기 표 1 및 표 2에서 보이는 것과 같이 여러 가지 박테리아에 대한 항균활성을 측정하였는데, 그 결과, 그람 양성균인 바실러스 세레우스(*B. cereus*)와 바실러스 서린지엔시스(*B. thuringiensis*)에 대하여 높은 활성을 보였고, 바실러스 리케니포미스(*B. licheniformis*), 바실러스 메가테리움(*B. megaterium*), 바실러스 퍼밀러스(*B. pumilus*)의 경우에는 비교적 낮은 활성을 보였다.

[0030] 그람 음성균의 경우, 외막의 투과성을 높이기 위해 EDTA를 처리한 박테리아에 대한 활성을 측정하였는데, 살모넬라(*S. Typhimurium*) SL1344, UK1, 14028s, DT104)와 대장균(*E. coli*) DH5 α, DH10B에 대해 높은 활성을 나타냈다. 하지만, 비브리오(*V. fischeri*)의 경우, 항균 활성을 띄지 않았다.

표 1

Gram positive bacteria	
Strain	Lytic activity %
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	76
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 21768	26.18
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	65
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 35666	60.08
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 29730	67.4
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	13.62
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	16.33
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	10.34
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 359983	-

[0031]

표 2

Gram negative bacteria (EDTA-treated)	
Strain	Lytic activity %
<i>Salmonella</i> Typhimurium SL1344	66.2
<i>Salmonella</i> Typhimurium UK1	59.13
<i>Salmonella</i> Typhimurium LT2	69.8
<i>Salmonella</i> Typhimurium 14028s	64.2
<i>Salmonella</i> Typhimurium DT104	59.28
<i>Escherichia coli</i> DH5α	56.73
<i>Escherichia coli</i> DH10B	65.22
<i>Vibrio fischeri</i> ATCC 700601	-

[0032]

[0033] [실시예 4: 엔돌라이신 LysBPS13의 내열성 측정]

[0034] LysBPS13의 내열성을 알아보기 위해 4~100℃ 사이의 온도에서 보관한 뒤, 효소활성을 측정하고자 하였다. 해당 온도에서 각각 보관한 후, 각각의 효소를 효소 저장 버퍼(20mM Tris-Cl, 300 mM NaCl, 30% Glycerol)에 희석하고, 활성을 측정하였다.

[0035] 그 결과, 4-70℃에서는 엔돌라이신에 가해진 온도와 관계없이 열처리를 하지 않은 LysBPS13과 같은 항

균활성을 보였다(도 3).

[0036] 한편, 80, 90, 100℃에서는 열처리를 하지 않은 대조군에 비해 활성이 떨어지기 시작했으나, 그래도 각각 60%, 40%, 15% 이상의 활성을 유지하였다.

[0037] **[실시예 5: 엔도라이신 LysBPS13의 아미다제 활성 측정]**

[0038] 본 실시예에서는 LysBPS13의 아미다제 활성을 조사하였다. 아미다제 활성은 N-아세틸무람산(N-acetylmuramic acid)로부터 유리된 락틱 그룹(lactic group)을 측정하는 방법을 통해 평가되었다.

[0039] 실험 결과, 정제된 LysBPS13을 바실러스 세레우스 ATCC 10876에서 추출한 펩티도글리칸에 처리하였을 때, 펩티도글리칸의 N-아세틸무람산과 L-알라닌(L-alanine) 사이의 아미드(amide) 결합이 끊김으로써, 유리 무람산(muramic acid)이 증가됨을 알 수 있었다(도 4).

[0040] 이 결과는 LysBPS13이 박테리아 세포벽에 있는 펩티도글리칸층의 아미드(amide) 결합을 절단하는 아미다제(amidase) 활성을 가짐을 보여준다.

[0041] **[실시예 6: LysBPS13을 함유하는 식품 첨가제의 제조]**

[0042] 표고버섯 분말 50중량%, 새우 분말 30중량%, 다시마 분말 15 중량%, 본 발명의 엔도라이신 LysBPS13 5 중량%를 혼합하여 조미료로 사용될 수 있는 식품 첨가제 300g을 제조하였다.

[0043] **[실시예 7: LysBPS13을 함유하는 식품의 제조]**

[0044] <우유 제조>

[0045] 시판 중인 S 제조의 우유 200 mL에 본 발명의 엔도라이신 LysBPS13을 1%(w/v) 첨가하여 본 발명에 따른 우유 조성물을 제조하였다.

[0046] <바나나 주스 제조>

[0047] 바나나를 믹서에 넣고 갈아 바나나 원액 180 mL를 준비한 후, 본 발명의 엔도라이신 LysBPS13을 1%(w/v) 첨가하여 본 발명에 따른 바나나 주스 조성물을 제조하였다.

[0048] **[실시예 8: LysBPS13을 함유하는 사료 첨가제 제조]**

[0049] α-토코페롤 5.0중량%, 오징어간유 0.75중량%, 효모 93.25중량%, 본 발명의 엔도라이신 LysBPS13 1.0중량%를 혼합하여 사료 첨가제를 1 kg을 제조하였다.

[0050] **[실시예 9: LysBPS13을 함유하는 사료의 제조]**

[0051] <육우 사료조성물 제조>

[0052] 육우용 사료조성물을 제조하였다. 기본사료는 미가공옥수수 5 kg, 면실피 펠렛 1.5 kg, 생미강 0.5 kg, 소맥피 1.5 kg, 면실피 0.45 kg, 대두박 1.0 kg, 소금 0.1 kg, 석회석 0.15 kg, 당밀 0.25 kg, 미량광물질 0.05 kg으로 조제되었다. 여기에 본 발명의 엔도라이신 LysBPS13을 0.1 kg 첨가하였다.

[0053] <산란계용 사료조성물 제조>

[0054] 본 발명의 엔도라이신 LysBPS13 1.0%(w/w)를 시판 산란계용 사료(디럭스 산란(제품명), 부국사료, 한국)에 첨가하여 산란계용 사료조성물 1 kg을 제조하였다.

[0055] <넙치 양식용 사료조성물 제조>

[0056] 어분 58중량%, 대두박 4중량%, 콘글루텐분 3중량%, 소맥분 28.7중량%, 오징어간유 4중량%, 비타민 혼합제 1.2중량% 및 미네랄 혼합제 1중량%를 포함한 기본 사료에 본 발명의 엔돌라이신 LysBPS13 1.0중량%를 첨가하여 넙치 양식용 사료조성물 1 kg을 제조하였다.

수탁번호

[0057]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12061BP

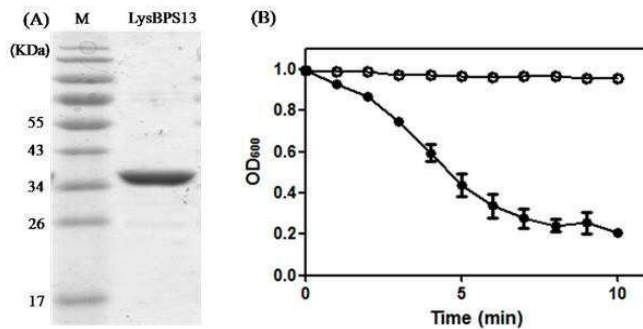
수탁일자 : 20111109

도면

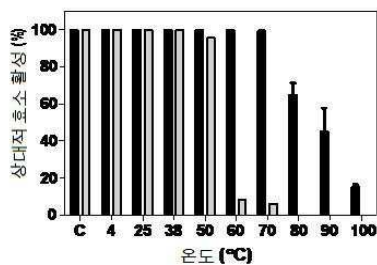
도면1



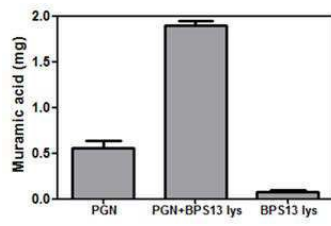
도면2



도면3



도면4



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)